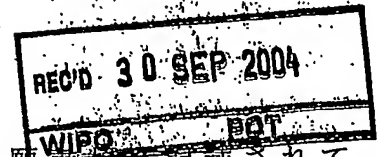


BEST AVAILABLE COPY

1017012004/011070

09.9.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 8 月 1 2 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 2 0 7 3 9 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 2 0 7 3 9 7]

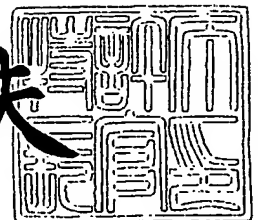
出 願 人 チ ッ ソ 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 5 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 1 4 6 7

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP-1388

【提出日】 平成15年 8月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/435
G01N 21/76
G01N 33/532

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区大川 5 - 1 チッソ株式会社横浜
研究所内

【氏名】 井上 敏

【特許出願人】

【識別番号】 000002071

【氏名又は名称】 チッソ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091731

【弁理士】

【氏名又は名称】 高木 千嘉

【電話番号】 03-3261-2022

【選任した代理人】

【識別番号】 100080355

【弁理士】

【氏名又は名称】 西村 公佑

【選任した代理人】

【識別番号】 100105290

【弁理士】

【氏名又は名称】 三輪 昭次

【選任した代理人】

【識別番号】 100125368

【弁理士】

【氏名又は名称】 金井 洋一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 2】 カルシウム結合型発光蛋白質に由来する発光活性を有する蛍光蛋白質であって、その蛍光スペクトルが、由来する発光蛋白質の発光スペクトルと同じである請求項 1 に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 3】 リガンドが結合している請求項 1 または 2 に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 4】 発光活性を有する蛍光蛋白質に発光基質を加える発光方法。

【請求項 5】 リガンドが結合している発光活性を有する蛍光蛋白質をそのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、発光基質を加えて発光させて対象物を観察する方法。

【請求項 6】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物およびカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンよりなり、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が 1 : 0.95 ~ 1.0 であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価または 3 価のイオンのモル比が 1 : 1 ~ 4 である発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 7】 アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が 1 : 1 であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価または 3 価のイオンのモル比が 1 : 2 ~ 3 である請求項 6 に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 8】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、アポイクオリン、アポクライチン、アポオベリン、アポマイトロコミン、アポミネオプシンおよびアポベルボインからなる群から選ばれる 1 種である請求項 6 または 7 に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項 9】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表 1 で表されるアミノ酸配列を有するアポイクオリンまたは配列表 1 で表される配列にお

いて1または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポイクオリンである、請求項8に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項10】 カルシウム結合型蛍光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表2で表されるアミノ酸配列を有するアポオベリンまたは配列表2で表される配列において1または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポオベリンである、請求項8に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

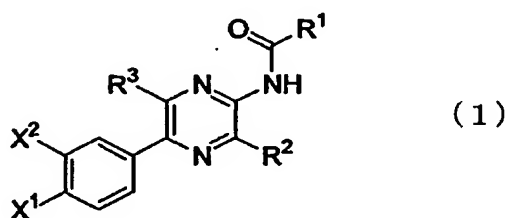
【請求項11】 カルシウム結合型蛍光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表3で表されるアミノ酸配列を有するアポクライチンまたは配列表3で表される配列において1または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポクライチンである、請求項8に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項12】 カルシウム結合型蛍光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表4で表されるアミノ酸配列を有するアポマイトロコミンまたは配列表4で表される配列において1または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポマイトロコミンである、請求項8に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

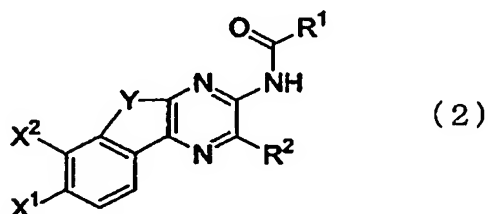
【請求項13】 蛋白質の遊離のSH基が水酸基で置換された請求項6～12のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項14】 セレンテラミドまたはその類縁化合物が下記式(1)または式(2)で表される請求項6～13のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【化1】



【化2】



式中、

R^1 は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、または脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R^2 は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、置換または非置換のアリールアルケニル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルケニル基、複素環式基であり、

R^3 は、水素原子、置換または非置換のアルキル基であり、

X^1 は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アルコキシ基またはアミノ基であり、

X^2 は、水素原子または水酸基であり、

Yは1～4個の炭素原子を有する2価の炭化水素基である。

【請求項15】 式(1)または式(2)において、

R^1 が非置換のアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基またはハロゲン原子で置換されたアリールアルキル基、またはシクロヘキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R^2 が非置換のアリール基、水酸基で置換されたアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基で置換されたアリールアルキル基、非置換のアリールアルケニル基、非置換の直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキル基、分枝鎖のアルケニル基、硫黄を含む複素環式基であり、

R^3 は、水素原子、メチル基または2-ヒドロキシエチル基であり、

X^1 は、水素原子、水酸基、フッ素原子、メトキシ基またはアミノ基であり、

Yはメチレン基、エチレン基、プロピレン基またはビニレン基である、請求項14に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項16】 式(1)または式(2)において、

R^1 がフェニル基、ベンジル基、p-ヒドロキシベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-クロロベンジル基、p-プロモベンジル基、p-ヨードベンジル

基、3,4-ジフルオロベンジル基、ペンタフルオロベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、ナフチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、メチル基、1-メチルプロピル基または2-メチルプロピル基であり、

R^2 がフェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、ベンジル基、 α -ヒドロキシベンジル基、フェニルエチル基、フェニルビニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、2-メチルプロペニル基、アダマンチルメチル基、シクロペンチルメチル基またはチオフェン-2-イル基である、請求項15に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項17】 カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンがカルシウムイオン、ストロンチウムイオン、鉛イオンである請求項6～16のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項18】 リガンドが結合した請求項6～17のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項19】 遊離のSH基に直接またはスパーサーを介してリガンドが結合した請求項18に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質。

【請求項20】 請求項18または19に記載のリガンドが結合した発光活性を有する蛍光蛋白質を、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、発光基質を加えて発光させて対象物を観察する方法。

【請求項21】 還元剤を添加する請求項6～19のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質の安定化方法。

【請求項22】 還元剤がジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである請求項21に記載の安定化方法。

【請求項23】 請求項6～19のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質と還元剤を含む組成物。

【請求項24】 還元剤がジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである請求項23に記載の組成物。

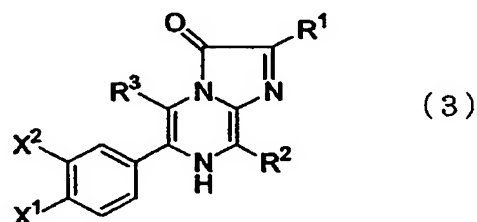
【請求項25】 請求項6～19のいずれか1項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質にセレンテラジンまたはその類縁化合物を反応させることを特徴とす

る発光方法。

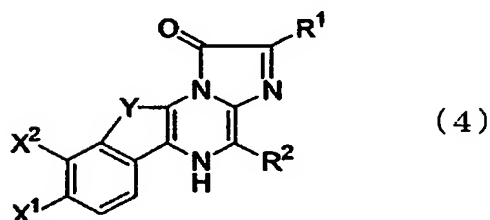
【請求項 26】 還元剤の存在下においてセレンテラジンまたはその類縁化合物を反応させることを特徴とする請求項 25 に記載の発光方法。

【請求項 27】 セレンテラジンまたはその類縁化合物が下記式 (3) または式 (4) で表される請求項 25 または 26 に記載の発光方法。

【化 3】



【化 4】



式中、

R¹は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、または脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R²は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、置換または非置換のアリールアルケニル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルケニル基、複素環式基であり、

R³は、水素原子、置換または非置換のアルキル基であり、

X¹は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アルコキシ基またはアミノ基であり、

X²は、水素原子または水酸基であり、

Yは 1～4 個の炭素原子を有する 2 価の炭化水素基である。

【請求項 28】 式 (3) または式 (4) において、

R^1 が非置換のアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基またはハロゲン原子で置換されたアリールアルキル基、またはシクロヘキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R^2 が非置換のアリール基、水酸基で置換されたアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基で置換されたアリールアルキル基、非置換のアリールアルケニル基、非置換の直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキル基、分枝鎖のアルケニル基、硫黄を含む複素環式基であり、

R^3 は、水素原子、メチル基または 2-ヒドロキシエチル基であり、

X^1 は、水素原子、水酸基、フッ素原子、メトキシ基またはアミノ基であり、

Y はメチレン基、エチレン基、プロピレン基またはビニレン基である、請求項 27 に記載の発光方法。

【請求項 29】 式 (3) または式 (4) において、

R^1 がフェニル基、ベンジル基、*p*-ヒドロキシベンジル基、*p*-フルオロベンジル基、*p*-クロロベンジル基、*p*-ブロモベンジル基、*p*-ヨードベンジル基、3,4-ジフルオロベンジル基、ペンタフルオロベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、ナフチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、メチル基、1-メチルプロピル基または 2-メチルプロピル基であり、

R^2 がフェニル基、*p*-ヒドロキシフェニル基、ベンジル基、 α -ヒドロキシベンジル基、フェニルエチル基、フェニルビニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、2-メチルプロペニル基、アダマンチルメチル基、シクロペンチルメチル基またはチオフェン-2-イル基である、請求項 28 に記載の発光方法。

【請求項 30】 請求項 6～19 のいずれか 1 項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせる発光キット。

【請求項 31】 蛍光蛋白質とセレンテラジンもしくはその類縁化合物の一

方または両方に還元剤を含む請求項 30 に記載の発光キット。

【請求項 32】 カルシウム結合型発光蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンの溶液を、生成するセレンテラミドまたはその類縁化合物の実質的にすべてがアポ蛋白質内に配位したまま残存し、新たな S-S 結合が実質的に生成しないような緩やかな条件で反応させる請求項 6～19 のいずれか 1 項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質の製造方法。

【請求項 33】 カルシウム結合型発光蛋白質と、 10^{-7} M 以下の濃度のカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンの溶液を反応させる請求項 32 に記載の製造方法。

【請求項 34】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物よりなり、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が 1:0.95～1.0 である蛍光蛋白質にカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンを反応させる請求項 6～19 のいずれか 1 項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質の製造方法。

【請求項 35】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物よりなり、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が 1:0.95～1.0 である蛍光蛋白質。

【請求項 36】 アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が 1:1 である請求項 35 に記載の蛍光蛋白質。

【請求項 37】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、アポイクオリン、アポクライチン、アポオベリン、アポマイトロコミン、アポミネオブシンおよびアポベルボインからなる群から選ばれる 1 種である請求項 35 または 36 に記載の蛍光蛋白質。

【請求項 38】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表 1 で表されるアミノ酸配列を有するアポイクオリンまたは配列表 1 で表される配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポイクオリンである、請求項 35～37 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

【請求項 39】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表 2 で

表されるアミノ酸配列を有するアポオベリンまたは配列表 2 で表される配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポオベリンである、請求項 35～37 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

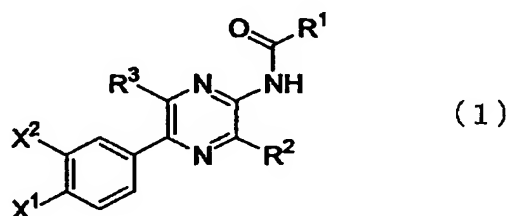
【請求項 40】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表 3 で表されるアミノ酸配列を有するアポクライチンまたは配列表 3 で表される配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポクライチンである、請求項 35～37 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

【請求項 41】 カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が、配列表 4 で表されるアミノ酸配列を有するアポマイトロコミンまたは配列表 4 で表される配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体アポマイトロコミンである、請求項 35～37 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

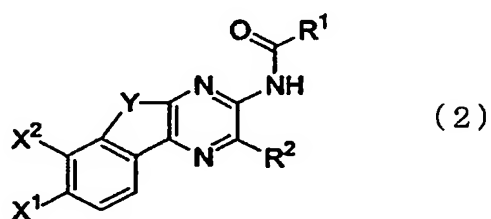
【請求項 42】 遊離の S H 基が水酸基で置換された請求項 35～41 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

【請求項 43】 セレンテラミドまたはその類縁化合物が下記式 (1) または式 (2) で表される請求項 35～42 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質。

【化 5】



【化 6】



式中、

R¹は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、または脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R²は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、置換または非置換のアリールアルケニル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルケニル基、複素環式基であり、

R³は、水素原子、置換または非置換のアルキル基であり、

X¹は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アルコキシル基またはアミノ基であり、

X²は、水素原子または水酸基であり、

Yは1～4個の炭素原子を有する2価の炭化水素基である。

【請求項44】 式(1)または式(2)において、

R¹が非置換のアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基またはハロゲン原子で置換されたアリールアルキル基、またはシクロヘキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R²が非置換のアリール基、水酸基で置換されたアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基で置換されたアリールアルキル基、非置換のアリールアルケニル基、非置換の直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキル基、分枝鎖のアルケニル基、硫黄を含む複素環式基であり、

R³は、水素原子、メチル基または2-ヒドロキシエチル基であり、

X¹は、水素原子、水酸基、フッ素原子、メトキシ基またはアミノ基であり、

Yはメチレン基、エチレン基、プロピレン基またはビニレン基である、請求項43に記載の蛍光蛋白質。

【請求項45】 式(1)または式(2)において、

R¹がフェニル基、ベンジル基、p-ヒドロキシベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-クロロベンジル基、p-ブロモベンジル基、p-ヨードベンジル基、3,4-ジフルオロベンジル基、ペンタフルオロベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、ナフチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、メチル基、1-メチルプロピル基または2-メチルプロピル基であり、

R²がフェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、ベンジル基、 α -ヒドロキシ

ベンジル基、フェニルエチル基、フェニルビニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、2-メチルプロペニル基、アダマンチルメチル基、シクロペンチルメチル基またはチオフェン-2-イル基である、請求項44に記載の蛍光蛋白質。

【請求項46】 リガンドが結合した請求項35～45のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質。

【請求項47】 遊離のSH基に直接またはスペーサーを介してリガンドが結合した請求項46に記載の蛍光蛋白質。

【請求項48】 還元剤を添加する請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質の安定化方法。

【請求項49】 還元剤がジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである請求項48に記載の安定化方法。

【請求項50】 請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質と還元剤を含む組成物。

【請求項51】 還元剤がジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである請求項50に記載の組成物。

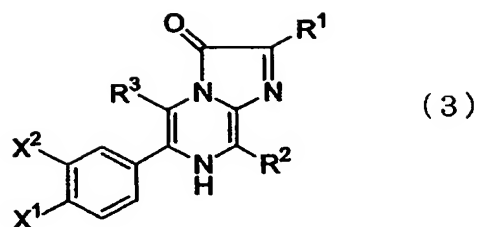
【請求項52】 請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質を用いるカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量方法。

【請求項53】 請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質を含むカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量試薬。

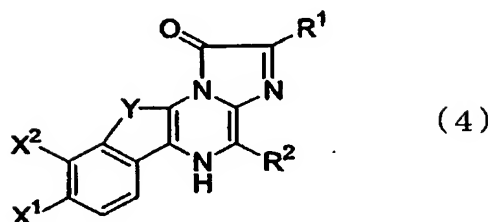
【請求項54】 請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質にセレンテラジンまたはその類縁化合物を反応させることを特徴とするカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

【請求項55】 セレンテラジンまたはその類縁化合物が下記式(3)または式(4)で表される請求項54に記載のカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

【化 7】



【化 8】



式中、

R¹は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、または脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R²は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、置換または非置換のアリールアルケニル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルケニル基、複素環式基であり、

R³は、水素原子、置換または非置換のアルキル基であり、

X¹は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アルコキシル基またはアミノ基であり、

X²は、水素原子または水酸基であり、

Yは1～4個の炭素原子を有する2価の炭化水素基である。

【請求項56】 式(3)または式(4)において、

R¹が非置換のアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基またはハロゲン原子で置換されたアリールアルキル基、またはシクロヘキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基であり、

R²が非置換のアリール基、水酸基で置換されたアリール基、非置換のアリー

ルアルキル基、水酸基で置換されたアリールアルキル基、非置換のアリールアルケニル基、非置換の直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキル基、分枝鎖のアルケニル基、硫黄を含む複素環式基であり、

R^3 は、水素原子、メチル基または2-ヒドロキシエチル基であり、

X^1 は、水素原子、水酸基、フッ素原子、メトキシ基またはアミノ基であり、

Y はメチレン基、エチレン基、プロピレン基またはビニレン基である、請求項55に記載のカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

【請求項57】 式(3)または式(4)において、

R^1 がフェニル基、ベンジル基、p-ヒドロキシベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-クロロベンジル基、p-ブロモベンジル基、p-ヨードベンジル基、3,4-ジフルオロベンジル基、ペンタフルオロベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、ナフチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、メチル基、1-メチルプロピル基または2-メチルプロピル基であり、

R^2 がフェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、ベンジル基、 α -ヒドロキシベンジル基、フェニルエチル基、フェニルビニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、2-メチルプロペニル基、アダマンチルメチル基、シクロペンチルメチル基またはチオフエン-2-イル基である、請求項56に記載のカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

【請求項58】 還元剤の存在下で反応させる請求項54～57のいずれか1項に記載のカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

【請求項59】 請求項35～47のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせるカルシウム結合型発光蛋白質製造用キット。

【請求項60】 蛍光蛋白質とセレンテラジンもしくはその類縁化合物の一方または両方に還元剤を含む請求項59に記載のカルシウム結合型発光蛋白質製造用キット。

【請求項61】 請求項46または47に記載のリガンドが結合した蛍光蛋

白質を、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、セレンテラジンまたはその類縁化合物を加えついでカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンを加えて発光させて対象物を観察する方法。

【請求項 62】 請求項 6～19 のいずれか 1 項に記載の発光活性を有する蛍光蛋白質のうち、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価のイオンを有する発光活性を有する蛍光蛋白質に、キレート剤を添加してカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価のイオンを除去する請求項 35～47 のいずれか 1 項に記載の蛍光蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アミューズメントの分野や生物学的な実験におけるマーカーとして利用することができる発光活性を有する蛍光蛋白質および蛍光蛋白質に関する。本発明はカルシウム結合型発光蛋白質から誘導される 2 種の蛋白質に関する。

【0002】

1 つは発光基質に作用して発光を起こす作用（酵素作用）を有するとともにそれ自身が光の励起をうけて蛍光を発生する新規な物質、つまり新規な発光活性を有する蛍光蛋白質に関する。この蛋白質は、カルシウムイオン結合型発光蛋白質を極めてゆっくりとカルシウムイオン等と反応させて得られ、カルシウムイオン結合型発光蛋白質のアポ蛋白質の内部にセレンテラミドまたはその類縁化合物が配位し、かつカルシウムイオン等が結合している。

【0003】

他の蛋白質は、上記の発光活性を有する蛍光蛋白質からカルシウムイオン等を除去することによって得られる別の新規な蛍光蛋白質である。この蛍光蛋白質はセレンテラジンまたはその類縁化合物と混合することによって、カルシウム結合型発光蛋白質となるので、生物学的な実験におけるマーカーとして利用することができる。

【0004】

【従来の技術】

代表的な生物発光反応は、「ルシフェラーゼ」とよばれる酵素（蛋白質）が触媒する、発光基質「ルシフェリン」（低分子有機化合物）の酸化反応である。発光は、ルシフェリンの酸化反応直後に生成する励起オキシルシフェリン分子が基底状態に戻る時に、そのエネルギーを光（フォトン）として放出するものである。

【0005】

一方、蛍光発光は、ある種の物質が紫外線や可視光線のような光のエネルギーを吸収して再び光を放出する現象である。光のエネルギーの吸収によって、励起された分子が基底状態にもどる時のエネルギーが、光（フォトン）として放出される。エネルギーを吸収する官能基（蛍光発色団）が吸収した励起エネルギーが速やかに再放出されたものが蛍光である。

【0006】

しかしながら、発光活性と蛍光発生能の双方を備えた物質の存在はこれまで知られていない。しかし、そのような物質が創出されれば、生物発光法による測定と蛍光発光法による測定が同一分子で可能となるので、産業上大きな貢献をすることは疑いが無い。

【0007】

また、これまで単離されている発光酵素は熱に対して不安定であり、例えば90℃で5分間処理すると発光活性が失われ、再び発光活性が回復することはなかった。したがって、耐熱性のある発光酵素の開発が強く望まれていた。

【0008】

一方、カルシウムイオン結合型発光蛋白質は、カルシウムイオンまたはストロンチウムイオン等と特異的に反応し、瞬間発光する。現在カルシウムイオン結合型発光蛋白質群として、イクオリン、クライチン、オベリン、マイトロコミン、ミネオプシンおよびベルボイン等が知られている。このなかで、遺伝子が単離されているものは、表1の通りである。

【0009】

【表 1】

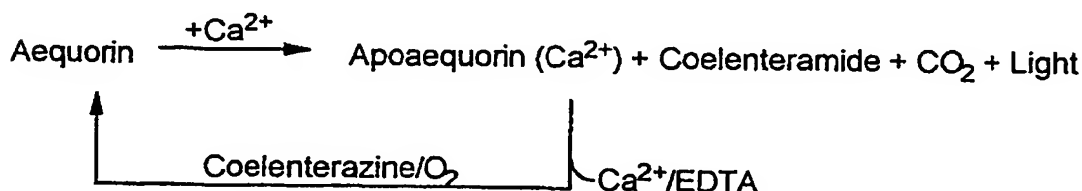
表 1

名前	生物種 学名	GenBank Acc. No.	発表者(年)
Aequorin	Aequorea victoria	L29571	Inouye et al.(1985)
Aequorin	Aequorea victoria		Charbonneau et al.(1985)
Aequorin	Aequorea victoria	M16103	Prasher et al.(1987)
Aequorin	Aequorea parva	AY013822	Luo et al.(2000)
Aequorin	Aequorea macrodactyla	AY013823	Luo et al.(2000)
Clytin (=Phialidin)	Clytia(=Phialidium) gregarium	L13247	Inouye & Tsuji(1993)
Mitrocomin (=Halistarin)	Mitrocoma(=Halistaura) cellularia	L31623	Fagan et al.(1993)
Obelin	Obelia longissima	U07128	Illarionov et al.(1995)
Obelin	Obelia geniculata	AF394688	Markova et al.(2002)

【0010】

イクオリンは、カルシウム結合型発光蛋白質群において、詳細な研究が行われている。イクオリン(Aequorin)は、微量のカルシウムイオンとのみ特異的に結合し、瞬間的に発光する蛋白質である。イクオリンは、189個のアミノ酸より構成される蛋白質部分であるアポイクオリン(アポ蛋白)、発光基質に相当するセレンテラジン、および分子状酸素が複合体(セレンテラジンのペルオキシド状)を形成した状態で存在していることが、X線結晶構造から明らかとなっている(非特許文献1)。イクオリンの発光反応および再生反応は次に示されるとおりである。

【化9】



【0011】

すなわち、イクオリン分子にカルシウムイオンが結合すると青色(最大波長=465~470nm)の瞬間発光をし、セレンテラジンの酸化物であるセレンテラミドがアポイクオリンから解離し、二酸化炭素を放出すると考えられている(非特許文献2参照)。一方、カルシウムイオンと結合し発光した後のアポイクオリ

ンは、瞬間発光能を持つイクオリンへ再生可能である。その再生法は、EDTA等のキレート剤によりアポイクオリンに結合しているカルシウムイオンを解離させ、還元剤（ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール等）の存在下、セレンテラジンおよび酸素とともに低温でインキュベーションすることにより達成される（非特許文献3参照）。

【0012】

天然より得られたイクオリンをカルシウムイオンと反応させて発光させた後に、キレート剤、還元剤および発光基質であるセレンテラジンの存在下、イクオリンへ再生させる実験の過程で、微弱な連続発光を示すことが報告されていた（非特許文献2参照）。さらに、発光後のイクオリンの溶液中に、微弱なルシフェラーゼ様活性を示す分子種が存在しているであろうと予測されていた。しかし、発光反応後の蛋白質に存在していると予測された微弱発光に関与する物質について、カルシウム-アポイクオリン-セレンテラミド、アポイクオリン-セレンテラミド、カルシウム-アポイクオリンの複合体等についての関与の確認はなされていなかった。また発光反応後の蛍光強度の測定結果から、発光反応後もアポイクオリン中に存在するセレンテラミドの量は、天然のアポイクオリンで17%、組換え体のアポイクオリンで33%であった。つまり、カルシウムイオン-アポイクオリン-セレンテラミドの存在が予測されていたが、それは均一な分子種として単離精製され、確認されていなかった。また、微弱な連続発光する機構についてもカルシウム-アポイクオリン-セレンテラミド、アポイクオリン-セレンテラミド、カルシウム-アポイクオリンの分離同定がされておらず、正確な事実にもとづいたものでなく、それは単に推測にしか過ぎなかった（非特許文献4参照）。

【0013】

一方、セレンテラミドを含まずカルシウムイオンが結合したアポイクオリン（カルシウム-アポイクオリン）にセレンテラジンを添加するだけで微弱連続発光を示すことは、既に本発明者により報告されている（特許文献1参照）。しかし、微弱発光する物質がいかなるものであるかは知られていなかった。

【0014】

【特許文献 1】

特開昭 64-47379 号

【非特許文献 1】

Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K. and Shimomura, O. (2000)
) Nature, 405, 372-376.

【非特許文献 2】

Shimomura, O. and Johnson, F.H. (1975) Nature 256, 236-238.

【非特許文献 3】

Shimomura, O. and Johnson, F.H. (1970) Nature, 227, 1356-1357

【非特許文献 4】

Shimomura, O. (1995) Biochem. J. 306, 537-543

【0015】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な発光性物質および新規な蛍光性物質を提供することである。
その目的で製造された物質は驚くべきことに、発光活性と蛍光発生能の双方を備えた最初の物質であることがわかった。

【0016】

したがって、本発明の第 1 番目の課題は、発光活性を有する蛍光蛋白質を新しく提供することである。詳細には、カルシウム結合型発光蛋白質から、新規な発光活性を有する蛍光蛋白質を提供することである。さらには、それを製造する方法および具体的な利用法を提供することである。

第 2 番目の課題は、その発光活性を有する蛍光蛋白質から、別の新規な蛍光蛋白質を製造し、その具体的な利用法を提供することである。

【0017】

【課題を解決するための手段】

発光活性を有する蛍光蛋白質

本発明は、新規な発光活性（酵素活性）を有する蛍光蛋白質を提供する。これは、発光基質の発光反応を触媒する活性と蛍光発生能を併せ持つ、これまで存在しなかった新規な概念の物質である。

【0018】

この新規な物質は、発光活性と蛍光発生能の双方を備えているので、生物発光法による測定と蛍光法による測定を1つの物質で可能にするため、産業上極めて有用である。具体的には、蛍光法により蛍光発生活性を測定し、同一試料に発光基質を加えてその発光を測定することができる。例えば、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質にリガンド（たとえば、抗体、ビオチン、レセプター等）を結合させ、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、発光基質を加えて生じる発光を検出すること、それ自体が光エネルギーを吸収して発生する蛍光を検出することの双方が可能となる。この2種類の高感度検出系をもちいて、目的物の検出・追跡等が可能となる。

【0019】

本発明で具体的に作成された物質は、カルシウム結合型発光蛋白質に由来し、その蛍光スペクトルは、由来する発光蛋白質の発光スペクトルと同じである。

本発明によって提供される具体的な発光活性を有する蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物およびカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンより構成されており、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が1:0.95~1.0であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンのモル比が1:1~4である。好ましくは、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が1:1であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンのモル比が1:2~3である。

【0020】

好ましい発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質は、アポイクオリン、アポクライチン、アポオベリン、アポマイトロコミン、アポミネオプシンおよびアポペルボインからなる群から選ばれる1種である。

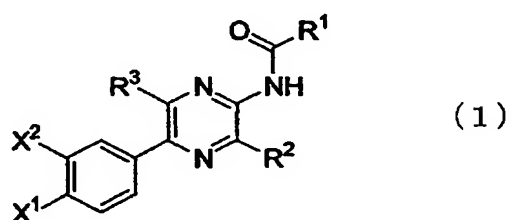
アポイクオリン、アポクライチン、アポオベリンおよびアポマイトロコミンは、それぞれ配列表1、2、3および4で表されるアミノ酸配列を有する。これら

は、配列表で表される配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体であってもよい。カルシウム結合型発光蛋白質は、その遊離の SH 基が水酸基で置換された変異型カルシウム結合型発光蛋白質であってもよい。

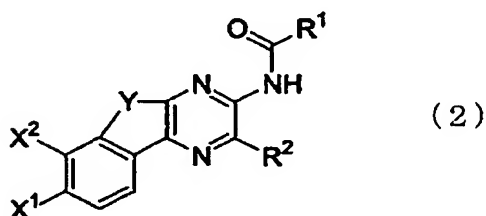
【0021】

発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するセレンテラミドまたはその類縁化合物は、下記式 (1) または式 (2) で表される。

【化10】



【化11】



式中、

R¹は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキル基、または脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基である。好ましくは、非置換のアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基もしくはハロゲン原子で置換されたアリールアルキル基、またはシクロヘキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基である。さらに好ましくは、フェニル基、ベンジル基、p-ヒドロキシベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-クロロベンジル基、p-ブロモベンジル基、p-ヨードベンジル基、3,4-ジフルオロベンジル基、ペンタフルオロベンジル基、フェニルエチル基、フェニルプロピル基、ナフチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、メチル基、1-メチルプロピル基または2-メチルプロピル基である。

R²は、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアリールアルキ

ル基、置換または非置換のアリールアルケニル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアルケニル基、複素環式基である。好ましくは、非置換のアリール基、水酸基で置換されたアリール基、非置換のアリールアルキル基、水酸基で置換されたアリールアルキル基、非置換のアリールアルケニル基、非置換の直鎖または分枝鎖のアルキル基、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキル基、分枝鎖のアルケニル基、硫黄を含む複素環式基である。さらに好ましくは、フェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、ベンジル基、 α -ヒドロキシベンジル基、フェニルエチル基、フェニルビニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、メチル基、エチル基、プロピル基、2-メチルプロピル基、2-メチルプロペニル基、アダマンチルメチル基、シクロペンチルメチル基またはチオフェン-2-イル基である。

R³は、水素原子、置換または非置換のアルキル基である。好ましくは、水素原子、メチル基または2-ヒドロキシエチル基である。

X¹は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アルコキシル基またはアミノ基であり、特に好ましくは水素原子、水酸基、フッ素原子、メトキシ基またはアミノ基である。

X²は、水素原子または水酸基である。

Yは1～4個の炭素原子を有する2価の炭化水素基であり、好ましくはメチレン基、エチレン基、プロピレン基またはビニレン基である。

【0022】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンとして好ましいものは、カルシウムイオン、ストロンチウムイオン、鉛イオンである。

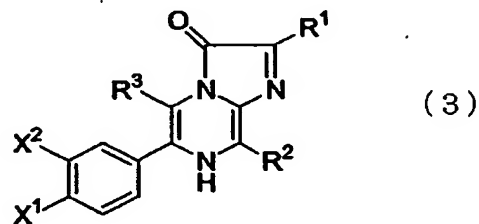
本発明は、カルシウム結合型蛍光蛋白質のアポ蛋白質部分にリガンドを結合させた発光活性を有する蛍光蛋白質を提供する。リガンドは、アポ蛋白質の遊離のSH基あるいはNH₂基に直接またはスペーサーを介して結合させることが望ましい。

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、セレンテラジンまたはその類縁化合

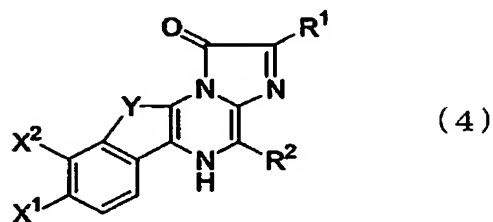
物を触媒的に分解して発光させる。その発光反応は、還元剤の存在下においてより長く持続する。

その発光反応に用いられるセレンテラジンまたはその類縁化合物は、下記式 (3) または式 (4) で表される。

【化 1 2】



【化 1 3】



式中の R¹、R²、R³、X¹、X²および Y は、式 (1) および式 (2) と同じである。

【0023】

リガンドが結合した発光活性を有する蛍光蛋白質を、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、発光基質を加えて発光させるとともに蛍光を利用して対象物を観察することに用いられる。

【0024】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、還元剤を添加することによって安定化することができる。特に好ましい還元剤はジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである。

本発明は、発光活性を有する蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせた発光キットを提供する。その発光キットの蛍光蛋白質またはセレンテラジンもしくはその類縁化合物の一方または両方に還元剤を含むことが好ましい。その発光キットはアミューズメントの分野で利用される。

【0025】

本発明は、発光活性を有する蛍光蛋白質の製造法を提供する。本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンの溶液を緩やかな条件で反応させることによって製造することができる。ここでいう緩やかな条件とは、生成するセレンテラミドまたはその類縁化合物の実質的にすべてがアポ蛋白質内に配位したまま残存し、新たなS-S結合が実質的に生成しないような条件である。例えば、カルシウム結合型発光蛋白質と、 10^{-7}M 以下の濃度のカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンの溶液を反応させることによって製造される。

【0026】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、後述するカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物よりなる（カルシウムイオンを含まない）蛍光蛋白質に、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンの溶液を反応させることによって製造することができる。

【0027】

蛍光蛋白質

本発明は、さらに発光活性を有する蛍光蛋白質から誘導されるカルシウムイオンを含まない新規な蛍光蛋白質を提供する。その蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物よりなり、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が1:0.95~1.0である。アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が1:1であることが好ましい。

【0028】

蛍光蛋白質を構成するカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質は、前述の発光活性を有する蛍光蛋白質のアポ蛋白質に対して説明したのと同じである。蛍光蛋白質を構成するセレンテラミドまたはその類縁化合物は、前述の発光活性を有する蛍光蛋白質に対して説明したのと同じである。

【0029】

本発明は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質部分にリガンドが結合した蛍光蛋白質をも提供する。リガンドはアポ蛋白質の遊離のSH基あるいはNH₂基に直接またはスペーサーを介して結合させることが望ましい。

本発明の蛍光蛋白質は、還元剤を添加することによって安定化される。特に好ましい還元剤はジチオスレイトールまたはメルカプトエタノールである。

本発明の蛍光蛋白質は、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンと反応して蛍光波長の異なった物質となる。したがって、その蛍光波長の変化を利用して、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量ができる。本発明は、蛍光蛋白質を含むカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量試薬を提供する。

【0030】

本発明の蛍光蛋白質にセレンテラジンまたはその類縁化合物を反応させるとカルシウム結合型発光蛋白質となる。したがって、本発明は蛍光蛋白質にセレンテラジンまたはその類縁化合物を反応させるカルシウム結合型発光蛋白質の製造方法を提供する。両者を還元剤の存在下で反応させることが望ましい。

カルシウム結合型発光蛋白質の製造方法に用いられるセレンテラジンまたはその類縁化合物は、前述の発光活性を有する蛍光蛋白質に対して説明したのと同じである。

【0031】

本発明の蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせたカルシウム結合型発光蛋白質製造用キットが提供される。そのカルシウム結合型発光蛋白質製造用キットの蛍光蛋白質またはセレンテラジンまたはその類縁化合物の一方または両方に還元剤を含むことが好ましい。

リガンドが結合した蛍光蛋白質を、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させ、セレンテラジンまたはその類縁化合物を加えるとカルシウム結合型発光蛋白質が形成される。ついでカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンを加えるとカルシウム結合型発光蛋白質は瞬間発光する。その瞬間発光をマーカーとして利用できる。さらに、未反応のまま

残存する蛍光蛋白質は蛍光発生能があるので、その蛍光を利用して対象物の観察を継続することができる。

【0032】

本発明の蛍光蛋白質は、先に述べた発光活性を有する蛍光蛋白質（カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物およびカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価のイオンより構成された蛋白質）をキレート剤で処理して、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価のイオンを除去することによって製造される。

【0033】

発光活性を有する蛍光蛋白質、蛍光蛋白質、イクオリンの相互関係

以上に述べた発光活性を有する蛍光蛋白質、蛍光蛋白質、イクオリンについて図4により説明する。図中、CTMはセレンテラミド、CTZはセレンテラジン、EDTAはエチレンジアミン四酢酸を意味する。

イクオリンはカルシウム結合型発光蛋白質の一種であり、アポ蛋白であるアポイクオリンの内部にセレンテラジンが配位し、分子状酸素が複合体（セレンテラジンのペルオキシド状）を形成した状態で存在する。本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を製造するには、セレンテラジンの溶液に極めて希薄なカルシウムイオン溶液を重ねし、長時間をかけて反応させる。この場合、イクオリンは発光し、基質のセレンテラジンはセレンテラミドと二酸化炭素に分解する。

【0034】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、極めて緩やかな条件でイクオリンとカルシウムイオンを反応させることによって得られるものであり、従来イクオリンを瞬間発光させた場合に生成するものとは異なったものである。従来のイクオリンを瞬間発光させる場合には、過剰のカルシウムイオンと一気に反応する。この場合にはアポ蛋白であるアポイクオリンの立体構造に急激な変化が起きて、セレンテラミドの大部分はアポイクオリンの内部には留まらない。しかし、極めて緩やかな条件で得られた本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質では、セレンテラミドはアポイクオリンの内部に配位したまま残存し、それらはほぼ完全に1:1の割合である。

【0035】

発光活性を有する蛍光蛋白質をEDTAで処理するとカルシウムイオンが除去されて新たな蛍光蛋白質が得られる。得られた蛍光蛋白質にカルシウムイオンを加えれば元の発光活性を有する蛍光蛋白質に戻る。この蛍光蛋白質にセレンテラジンを加えると、アポイクオリン内部のセレンテラミドがセレンテラジンと置換されてイクオリンとなる。このイクオリンはカルシウムイオンと反応して瞬間発光する。

【0036】

発光活性を有する蛍光蛋白質およびそれからカルシウムイオン等を除去して生成される蛍光蛋白質の蛍光の波長は、それらに含まれる発色団、すなわちセレンテラミドまたはその類縁化合物によって決まる。

発光活性を有する蛍光蛋白質にセレンテラジンを添加すれば、発光反応を起こす。この場合、添加したセレンテラジンはアポイクオリン内部に取り込まれて触媒作用によって酸化される。したがって、アポイクオリン内部のセレンテラミドは常に入れ替わることになる。発光触媒活性は、還元剤の有無などの条件に左右されるがかなり長期間持続する。しかし、最終的にはアポイクオリン分子中のSH結合がS-S結合を形成してその発光活性を失う。還元剤を添加すれば、S-S結合の形成が阻止されるので、発光活性が持続すると考えられる。システイン残基の欠失した変異アポイクオリンは、天然型イクオリンと同等の活性をもつことが知られており、システイン残基の欠失イクオリンから調製した発光活性を有する蛍光蛋白質は、還元剤の添加が不要である可能性が大きい。

【0037】

イクオリンのEFハンドに結合しているように図示されているカルシウムイオンは、3個のすべてに結合していなくとも良い。また、カルシウムイオンはそれと置換可能な2価または3価のイオンであってもよい。

【0038】

【発明の効果】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、発光基質を触媒的に発光させるとともに蛍光発生能がある。アミューズメントの分野や生物学的な実験におけるマー

カーとして利用することができる。発光活性と蛍光発生能の一方または双方を測定することにより、マーカーとして広い分野で応用できる。

本発明のカルシウム等を含まない蛍光物質は、セレンテラジンと混合することによって即時にカルシウム結合型発光蛋白質に変換することができる。生物学的な実験において、カルシウムによる瞬間発光と蛍光発生能の一方または双方を測定することにより、マーカーとして広い分野で応用できる。

【0039】

【発明の実施の形態】

1. 発光活性を有する蛍光蛋白質

1-1. 発光活性を有する蛍光蛋白質の構造

カルシウム結合型発光蛋白質は、カルシウムイオンと遭遇した場合の敏感な瞬間発光を利用してカルシウムの検出に用いられる。カルシウム結合型発光蛋白質は、カルシウムイオンと瞬時に反応し、そのアポ蛋白質の立体構造が一気に変化する。そのため、アポ蛋白質の内部で生成するセレンテラミドは大部分アポ蛋白質内部から放出されてしまう（非特許文献4参照）とともに、アポ蛋白質の遊離のSH基が酸化されてS-S結合を形成する。したがって、これまでイクオリンのようなカルシウム結合型蛍光発光蛋白質をカルシウムで発光させた後に微弱な発光活性（ルシフェラーゼ）活性や蛍光発生能が観察されていながら、その原因物質が採取できなかった。

【0040】

本発明者は、カルシウム結合型発光蛋白質のこれまでのカルシウムイオンの反応形態からは全くかけ離れた条件、つまり極めて緩やかな反応条件で両者を反応させることによって、新規な発光活性を有する蛍光蛋白質を採取することに成功した。

本発明の新規な発光活性を有する蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物およびカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンより構成されている。アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比は1：0.95～1.0であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換

可能な 2 価もしくは 3 価のイオンのモル比は 1 : 1 ~ 4 である。好ましくは、アポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比は 1 : 1 であり、アポ蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンのモル比は 1 : 2 ~ 3、さらに好ましくは 1 : 3 である。セレンテラミドまたはその類縁化合物は、アポ蛋白質の内部に配位しており、カルシウムイオンは主としてアポ蛋白質の EF ハンドに結合している。本発明の発光性を有する蛍光蛋白質は、従来のルシフェラーゼと比較して熱安定性に優れているので、これまでルシフェラーゼを用いることができなかった分野にも応用が可能である。

【0041】

1-2. 発光活性を有する蛍光蛋白質の製造

発光活性を有する蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質とカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な 2 価もしくは 3 価のイオンを、極めて緩やかな（反応速度が極めて遅い）条件で反応させることにより製造される。本発明において緩やかに反応させるとは、カルシウム結合型発光蛋白質とカルシウムイオン等のイオンが反応した後に、セレンテラミドまたはその類縁化合物がアポ蛋白質に配位したまま残り、かつ新たな S-S 結合が実質上生成しないような条件で反応させることを意味する。

【0042】

そのような反応条件は、高粘度のカルシウム結合型発光蛋白質溶液に、非常に希薄なカルシウムイオン等の溶液を重層し、低温度で長時間にわたって反応させることにより達成される。この際、カルシウムイオンの濃度は小さい方が好ましい。濃度が小さければカルシウム結合型発光蛋白質と接触（反応）する頻度が小さくなるからである。具体的には、カルシウムイオンの濃度は、 10^{-7}mol/l 以下であることが好ましい。逆に、カルシウム結合型発光蛋白質溶液の濃度は高い方が好ましい。蛋白質溶液の濃度が高ければ、蛋白質溶液の粘度も高くなり、カルシウムイオンとの反応がゆっくり進行するからである。

【0043】

具体的には、 10^{-7}M (mol/l) 以下の濃度のカルシウムイオンまたはカル

シウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンの水溶液を、カルシウムイオン結合型発光蛋白質に対して1～4のモル比となるように添加して、両者を反応させる。カルシウムイオン等のイオンとカルシウムイオン結合型発光蛋白質のモル比は、反応が緩やかに進められるならば、目的とする発光活性を有する蛍光蛋白質におけるモル比以上であっても構わない。本発明で必要とされる反応条件を達成するためには、反応容器のデザインの変更、溶媒の選択、半透膜の使用等のバリエーションが考えられ、本明細書に記載されたものに限定されるものではない。

【0044】

1-3. 発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するアポ蛋白質

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するアポ蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質が用いられる。ここでいうカルシウム結合型発光蛋白質とは、カルシウムイオンまたはそれと同等な2価または3価のイオンと反応して発光するものを指す。例えば、イクオリン、クライチン、オベリン、マイトロコミン、ミネオプシンおよびベルボインを挙げることができる。これらは、天然から採取したものであっても、遺伝子工学的に製造したものであってもよい。さらにそのアミノ酸配列を天然のものから遺伝子組換え技術によって変異させたものであってもよい。

【0045】

天然型イクオリンのアポ蛋白であるアポイクオリンのアミノ酸配列は配列表1に示される。配列表1に記載のアミノ酸配列を有するもののほか、公知のまたは未知のその変異体であってカルシウム結合型発光蛋白質を形成するものであればすべて使用できる。したがって、本発明で使用されるアポイクオリンには、配列表1に記載のアミノ酸配列を有するアポイクオリンおよび配列番号1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異型アポイクオリンが含まれる。特に好ましい変異型アポイクオリンの例として、配列番号1において1番目のValがAla-Asn-Serで置換されたものが挙げられる。

【0046】

天然型クライチンのアポ蛋白であるアポクライチンのアミノ酸配列は配列表2

に示される。天然型オベリンのアポ蛋白であるアポオベリンのアミノ酸配列は配列表3に示される。天然型マイトロコミンのアポ蛋白であるアポマイトロコミンのアミノ酸配列は配列表4に示される。これらは、それぞれの配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異型のものであってもよい。

【0047】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、蛋白質中のシステイン残基の遊離SH基が酸化されてS-S結合を生成すると発光活性を失う。したがって、システイン残基をセリン残基で置換したものは、S-S結合が生じないため活性が持続的であると期待される。

【0048】

1-4. 発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するセレンテラミド

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するセレンテラミドまたはその類縁化合物は、前述の式(1)または式(2)で示される。

セレンテラミドまたはその類縁化合物として、具体的な好ましい化合物は後述する。

【0049】

1-5. 発光活性を有する蛍光蛋白質を構成する金属イオン

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質に結合する金属イオンは、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンである。ここで、カルシウムイオンと置換可能なイオンとは、カルシウムイオンに代えてイクオリンなどのカルシウム結合型蛍光蛋白質と反応させた場合に、発光反応を起こすものである。つまり、カルシウム結合型蛍光蛋白質に対して、カルシウムイオンと同等の作用をするものである。例えば、マグネシウムイオン (Mg^{2+})、ストロンチウムイオン (Sr^{2+})、バリウムイオン (Ba^{2+})、鉛イオン (Pb^{2+})、コバルトイオン (Co^{2+})、ニッケルイオン (Ni^{2+})、カドミウムイオン (Cd^{2+})、イットリウムイオン (Y^{3+})、ランタンイオン (La^{3+})、サマリウムイオン (Sm^{3+})、ユウロピウムイオン (Eu^{3+})、ジスプロシウムイオン (Dy^{3+})、ツリウムイオン (Tm^{3+})、イットリビウムイオン (Yb^{3+}) を

挙げることができる。これらのうち、2価の金属イオンが好ましい。より好ましくは遷移金属以外の2価の金属イオン、例えば Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Pb^{2+} ある。

【0050】

また、これらのイオンは少なくとも1個が、いわゆるカルシウム結合型発光蛋白質のEFハンドに結合していればよい。2個以上、特に好ましくは3個のこれらのイオンが結合しているのが好ましい。なお、ここで挙げている数は、いわゆるカルシウム結合型発光蛋白質1分子に対していくつの2価の金属イオンが結合しているかを平均値として示しており、必ずしも整数の値をとるものではない。また、結合個数としての平均値は、B.B.R.C(1996)221, 77-81に記載されているカルシウム電極を用いた滴定法または通常の Ca^{2+} の原子吸光法に従って算出する。

【0051】

1-6. 発光活性を有する蛍光蛋白質とリガンドの結合物

発光活性を有する蛍光蛋白質は、直接またはスパーサーを介してリガンドと結合させることができる。リガンドとは、発光活性を有する蛍光蛋白質を検出マーカーとして使用する際に、検出すべき物質（蛋白質、ペプチド、酵素、レセプター、抗原、抗体）に直接的にまたは間接的に結合させる物質である。

レセプターを検出する場合においては、レセプターに結合するシグナルペプチド（インシュリンのようなホルモン、サイトカイン、TNF、Fasリガンド等）がリガンドとなる。シグナルペプチドを検出する場合には受容体を構成するタンパクがリガンドとなる。薬物の受容体を検出する場合には薬物がリガンドとなり、薬物を検出する場合は薬物受容体がリガンドとなる。

【0052】

酵素を検出する場合にはその基質がリガンドとなり、酵素の基質を検出する場合には酵素がリガンドとなる。核酸に対して特異的に結合する他の核酸を検出する場合には、相補的な核酸がリガンドとなる。多糖類に対して特異的に結合する他の物質を検出する場合には、多糖類がリガンドとなる。血液凝固因子と特異的に結合するレクチンや転写因子等のDNA結合性蛋白質等もリガンドとなり得る。

【0053】

また、検出すべき物質に間接的に結合させるものとしてビオチン、アビジンもしくはストレプトアビジンをリガンドとすることが好ましい。例えば、検出すべき物質に対する抗体とアビジンのコンジュゲートを検出すべき物質と結合させ、ビオチンを結合させた発光活性を有する蛍光蛋白質によって、両者を間接的に結合する。したがって、リガンドには、検出対象に直接的または間接的に結合可能な広範囲の物質が包含され、好ましくは、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、抗体、核酸等である。

【0054】

リガンドは本発明の蛍光活性を有する蛍光蛋白質に直接結合させるか、またはその製造原料であるカルシウム結合型蛍光蛋白質に結合させることができる。つまり、リガンドを結合させた発光活性を有する蛍光蛋白質は、発光活性を有する蛍光蛋白質にリガンドを直接結合させる方法、カルシウム結合型蛋白質にリガンドを結合させ次いでカルシウムイオン等と緩やかに反応させる方法、アポ蛋白質にリガンドを結合させ次いでセレンテラジンまたはその誘導体と反応させてカルシウム結合型蛍光蛋白質としそれをカルシウムイオン等と緩やかに反応させる方法のいずれによっても製造することができる。

【0055】

蛋白質にリガンドを結合させる方法は数多く報告されており、本発明においてはあらゆる方法を利用することができる。リガンドは、アポ蛋白質中のSH基、水酸基、アミノ基等を介して結合させることができる。リガンドとの結合は、蛋白質の分子サイズおよびリガンドとの立体障害を考慮して、直接的にまたはリンカーもしくはスペーサーを介して結合させる。結合試薬としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、4-ニトロフェノール等によりリガンドもしくはリガンドとスペーサーを結合させて作ることができる。スクシンイミジル6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート(NHS-LC-Biotin)やビオチン4-ニトロフェニルエステルのようにそれ自体が市販されているものも利用できる。

【0056】

水酸基またはアミノ基へリガンドを結合させる場合、カルシウム結合型蛍光蛋白質

白質の分子内で—S—S—を形成するのを防ぐためメルカプトエタノール、ジチオスレイトールのような還元剤のその存在下で行うことが望ましい。

リガンドを結合させたカルシウム結合型発光蛋白質（リガンドと結合したアポ蛋白質とセレンテラジンで構成される）を、先に述べた極めて緩やかな条件でカルシウム等のイオンと反応させることによって、リガンドと結合した発光活性を有する蛍光蛋白質を製造することができる。

【0057】

1-7. 発光活性を有する蛍光蛋白質の利用

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、発光物質に接触として作用しそれを発光させるので、発光触媒として利用できる。発光基質はセレンテラジンまたはその類縁化合物である。ここでセレンテラジンの類縁化合物とは、セレンテラジンと同様にイクオリン等のカルシウム結合型発光蛋白質を構成しうる化合物を指す。具体的なセレンテラジンの類縁化合物は前述の式（3）または式（4）で示される。

【0058】

これらのセレンテラジンおよびその類縁化合物は、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質の触媒作用によって対応するセレンテラミドおよび2酸化炭素に酸化される際発光する。セレンテラジンまたはその類縁化合物を、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質に添加した場合の発光は連続的（持続的）である。添加されたセレンテラジンが消費され尽くすか、触媒活性が無くなるまで発光は持続する。

【0059】

後述の実施例16にも記載されているように、セレンテラジンおよびh-セレンテラジンが優れた発光基質であり、なかでもh-セレンテラジンが良い。

【0060】

1-7-1. 還元剤の添加による発光活性の維持

実施例13によれば、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、90℃に加熱した後でも、発光活性を有する。この場合、ジチオスレイトールのような還元剤を添加することによって発光活性の低下が著しく抑制することができる。また、

実施例 14 によれば、常温において発光反応が開始してから 15 分を経過すると発光活性が低下する。しかし、還元剤を共存させると、60 分を経過してもその発光強度は低下しない。したがって、還元剤と一緒に添加することで、発光強度を低下させることなく長時間連続発光させ続けることができる。このように高温処理後も発光活性が発揮されることは、ルシフェラーゼによる生物発光の分野では驚異的なことである。生物発光を利用するマーカーとして新規な分野での応用が期待される。

【0061】

還元剤による発光活性の持続は、アポ蛋白質中の遊離の S H 基の酸化が還元剤によって阻止されるため、触媒活性が長く持続するからである。好ましい還元剤は、ジチオスレイトールおよびメルカプトエタノールである。

【0062】

1-7-2. 発光活性を有する蛍光蛋白質のアミューズメントへの利用

発光性蛋白質の用途の一つはアミューズメントである。アミューズメントのために利用するには、発光させようとする時、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質にセレンテラジンまたはその類縁化合物を混ぜ合わせればよい。そのためには、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質と、セレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせたキットとしておくのが望ましい。その場合、発光活性を有する蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を、使用時に簡単に混合できるような容器に入れたキットとしておくのが好ましい。例えば、2 室に仕切ったプラスチックチューブにそれぞれを入れておき、発光させるときにその仕切りを破断すれば両者が混合されて発光する。このような利用に関して既にいくつかの報告があり（例えば WO 97/29319）、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質はいかなる方法にも応用できる。本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質の発光活性は、還元剤によって安定化されるので、発光活性を有する蛍光蛋白質およびセレンテラジンまたはその類縁化合物の一方もしくはその両方に還元剤を添加しておくのが望ましい。

【0063】

1-7-3. 発光活性を有する蛍光蛋白質の検出マーカーとしての利用

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質の最も重要な用途は、検出マーカーとしての利用である。リガンドに結合させた本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、そのリガンドを介して検出対象物（例えばウイルスや細胞上の特定の抗原蛋白質）に結合する。それにセレンテラジンを添加すれば発光する。これまで、蛍光性物質の蛍光をマーカーとして利用することは良く知られている。しかし、セレンテラジンの発光による光の検出感度は蛍光発光の際の検出感度に比べて100倍以上高い。しかもこの発光は持続的であるから長時間の観察に適している。

【0064】

さらに、セレンテラジンを消費し尽くした後においても、光エネルギーを吸収して蛍光を発生するのでその蛍光を利用して観察を続けることもできる。この方法は、生物学的な実験等において極めて有効な手段として期待される。このような利用法は、触媒作用による発光活性と蛍光発生能の両者を持った本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質によって初めて可能となった。

この場合にも還元剤を添加することによって発光活性の持続性を高めることができ、さらに高温での発光が可能となる。したがって、観察すべき物質を加熱前に観察し、加熱後も引き続き同一のマーカーによって観察することが可能となる。これは、これまでになかった全く新しい生物発光マーカーの応用分野を開くと期待される。

【0065】

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質が発生する蛍光の波長（色）は、その蛋白質の中に保持されているセレンテラミド（発色団）の種類によって変化する。また、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質の触媒作用によって、セレンテラジンまたはその類縁化合物が酸化発光する場合の光の波長も生成するセレンテラミド（発色団）の種類によって変化する。

【0066】

1-7-4. 別の蛍光蛋白質を製造するための利用

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を構成するカルシウムイオンおよびそれと置換可能な2価のイオンは、キレート剤と処理することによって除去され、全く別の新規な蛍光蛋白質となる。これについては、2の項に記述する。

【0067】

1-8. 発光活性を有する蛍光蛋白質の特質

1-8-1. 熱安定性に優れている

本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は熱安定性に優れている。実施例9に示したように、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、40℃においても蛍光強度は低下しない。45℃で10分保持するとその強度が低下する。しかし、加熱によって一旦低下した蛍光強度は、加熱温度が65℃以下であれば冷却することによって完全に回復する。さらに、実施例10に示したように、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質を、90℃で3分間加熱後、室温に20分放置することにより93%の蛍光発生能が回復した。65℃以下の加熱温度においては、100%の蛍光能が回復する。

【0068】

これまで知られている蛍光性蛋白質やルシフェラーゼは加熱によりその発光活性を失う。また、カルシウム結合型発光蛋白質も加熱により発光能を失う。それに比較して本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、一時的に高温の条件を経由してもその発光活性が回復される。これは従来の蛍光性蛋白質、ルシフェラーゼ、カルシウム結合型発光蛋白質等に勝る大きな利点であり、その有用性が極めて高い。

【0069】

1-8-2. 保存安定性に優れている

発光活性を有する蛍光蛋白質は保存安定性に優れている。安定化剤等を添加することなく、-80℃および4℃で保存し、6ヶ月経過時点での蛍光強度を保存開始時点での蛍光強度と比較したが-80℃では全く変わらなかった。4℃でも殆ど変わらなかった。カルシウム結合型発光蛋白質が保存安定性において課題を有していて、安定化剤等を添加することにより-80℃で長期保存をしていることから考えると、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は著しい保存安定性を有するものであることがわかる。

【0070】

これまでに説明した発光活性を有する蛍光蛋白質から、新規な別の蛍光蛋白質

が製造されるので、以下にそれについて説明する。

【0071】

2. 蛍光蛋白質の構造

2-1. 蛍光蛋白質の構造

本発明の蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質に、セレンテラミドまたはその類縁化合物が配位したものである。また別の表現をすれば、前述の本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質からカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンを取り除いたものである。

本発明の蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質に、セレンテラミドまたはその類縁化合物からなり、アポ蛋白質に、セレンテラミドまたはその類縁化合物のモル比が1:0.95~1.0であり、好ましくは1:1である。

【0072】

2-2. 蛍光蛋白質の製法

本発明の蛍光蛋白質は、前述の発光活性を有する蛍光蛋白質からカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価のイオンを取り除くことによって得られる。2価イオンは、発光活性を有する蛍光蛋白質をキレート剤と処理することによって除去される。

【0073】

キレート剤は、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンと強く結合するものであれば特に制限されない。例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコールビス(β -アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、trans-1,2-ジアミノシクロヘキサンN,N,N',N'-四酢酸(CyDTA)およびN-(2-ヒドロキシエチル)イミノ二酢酸(HIDA)を挙げることができる。

【0074】

2-3. 蛍光蛋白質を構成するアポ蛋白質

前述の発光活性を有する蛍光蛋白質についてした説明が適用される。

【0075】

2-4. 新規な蛍光蛋白質を構成するセレンテラミド

前述の発光活性を有する蛍光蛋白質についてした説明が適用される。

【0076】

2-5. 新規な蛍光蛋白質とリガンドの結合物

前述の発光活性を有する蛍光蛋白質についてした説明が適用される。リガンドが結合している発光活性を有する蛍光蛋白質からカルシウムイオン等を除去してリガンドが結合した蛍光蛋白質を調製することができる。またリガンドが結合していない発光活性を有する蛍光蛋白質からカルシウムイオン等を除去して調製した蛍光蛋白質にリガンドを結合させることもできる。

【0077】

2-6. 新規な蛍光蛋白質の利用

2-6-1. カルシウムの検出

本発明の蛍光蛋白質は、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンと反応して蛍光波長の異なった物質となる。したがって、その蛍光波長の変化を利用して、カルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量ができる。本発明の蛍光蛋白質を含むカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能なイオンの検出および定量試薬が提供される。

【0078】

2-6-2. 検出マーカーとしての利用

リガンドが結合した蛍光蛋白質はウイルスや細胞上にある物質の検出マーカーとして利用できる。リガンドが結合した蛍光蛋白質を、そのリガンドを介して観察すべき対象物に結合させる。ついでセレンテラジンまたはその類縁化合物を加えるとカルシウム結合型発光蛋白質が形成される。さらにカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンを加えるとカルシウム結合型発光蛋白質は瞬間発光する。その瞬間発光をマーカーとして利用できる。さらに、セレンテラジンと反応していない蛍光蛋白質は蛍光発生能があるので、その蛍光を利用して対象物の観察を継続することができる。カルシウムイオン等による瞬間発光と、蛍光発光の両方を同一のマーカーで行えることは画期的なことであり、広範な用途が期待される。

【0079】

2-6-3. カルシウム結合型発光蛋白質の製造への応用

本発明の蛍光蛋白質は、発光基質であるセレンテラジンまたはその類縁化合物と混合するだけでイクオリンのようなカルシウム結合型発光蛋白質に変換することができる。

通常、カルシウム結合型発光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質をカルシウムイオンと反応させた廃残物に、キレート剤、還元剤およびセレンテラジンを低温で添加して再生している。再生時の温度は、4℃が最も効率が良く、37℃では殆ど再生されない。アポ蛋白質からカルシウム結合型発光蛋白質を新たに製造する場合でも、キレート剤、還元剤およびセレンテラジンを低温で添加して同様の操作をする必要がある。

それに対して、本発明の蛍光蛋白質からカルシウム結合型発光蛋白質を製造する場合は、セレンテラジンを添加するだけでよい。その添加の温度条件も、25℃では4℃と同様に還元剤の添加なしに90モル%以上がカルシウム結合型発光蛋白質に変換される。37℃の場合には、還元剤を添加することにより、約80モル%がカルシウム結合型発光蛋白質に変換される。詳細な記述は実施例12にある。

【0080】

カルシウム結合型発光蛋白質の製法に使われるセレンテラジンおよびその類縁化合物については、前述のとおりである。具体的なセレンテラジンおよびその類縁化合物は前述の式(3)または式(4)で示される。

本発明の蛍光蛋白質とセレンテラジンまたはその類縁化合物を組み合わせたカルシウム結合型発光蛋白質製造用キットが提供される。そのカルシウム結合型発光蛋白質製造用キットの蛍光蛋白質またはセレンテラジンまたはその類縁化合物の一方または両方に還元剤を含むことが好ましい。

【0081】

2-6-4. 発光活性を有する蛍光蛋白質の製造への応用

本発明の蛍光蛋白質にカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンを加えることにより、前述の発光活性を有する蛍光蛋

白質を製造することができる。

【0082】

2-7. 発光活性を有する蛍光蛋白質は保存安定性に優れている

本発明の蛍光蛋白質は保存安定性に優れている。安定化剤等を添加することなく、-80℃および4℃で保存し、6ヶ月経過時点での蛍光強度を保存開始時点での蛍光強度と比較したが-80℃では全く変わらなかった。4℃でも殆ど変わらなかった。カルシウム結合型蛍光蛋白質が保存安定性に課題を有していて、安定化剤等を添加することにより-80℃で長期保存をしていることから考えると、本発明の蛍光蛋白質は著しい保存安定性を有するものであることがわかる。

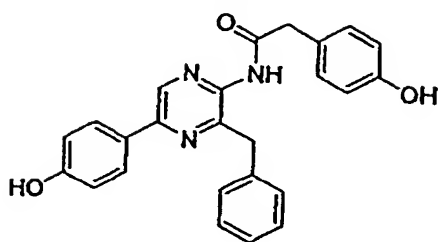
【0083】

以下に特に重要なセレンテラジン、セレンテラミド、e-セレンテラジン、e-セレンテラミド、h-セレンテラジンおよびh-セレンテラミドの化学構造式をまとめて示す。

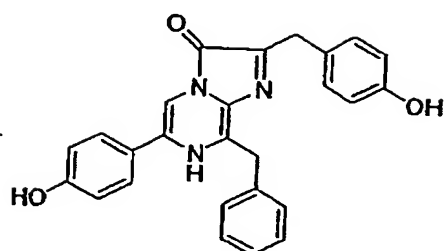
【0084】

【化 14】

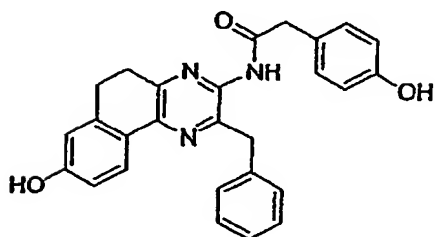
セレンテラミド



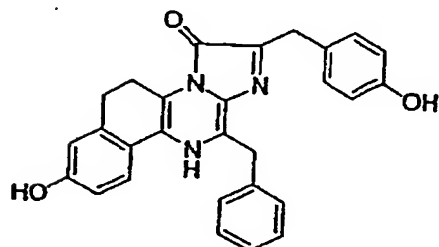
セレンテラジン



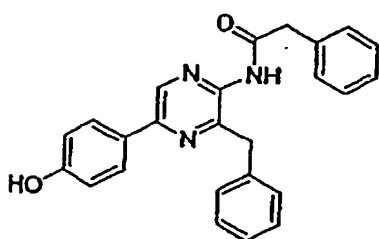
e-セレンテラミド



e-セレンテラジン



h-セレンテラミド



h-セレンテラジン



【0085】

【実施例】

以下に実施例により本発明を説明するが、実施例は本発明を制限するものではない。

実施例 1 組換えイクオリンの調製法

組換えイクオリンは、以下に示すように、特開平 1-132397 号公報に記載される大腸菌にて組換えアポイクオリン遺伝子を発現させ、セレンテラジンと結合させて組換えイクオリンへと再生した後、特開 2001-270899 号公

報に記載されるように精製して取得した。得られる組換えアポイクオリンのN-末端は、Ala-Asn-Ser-より始まる191個のアミノ酸より構成されている（配列表1のN-末端のVal-がAla-Asn-Ser-で置換されたもの）。

【0086】

1) 組換えアポイクオリンの大腸菌での発現

大腸菌において組換えアポイクオリンを発現させるために、アポイクオリン遺伝子を包含するpAQ440（特開昭61-135586号公報）から構築した、アポイクオリン遺伝子発現ベクターpiP-HE（特開平1-132397号公報）を用いた。宿主として大腸菌WA802株を使用し、常法によりpiP-HEで該菌株を形質転換した。得られた形質転換株を30℃で一晩培養後、アンピシリン（50 μ g/ml）を含有する50mlのLB液体培地（水1リットルあたり、バクトトリプトン10g、イーストエキストラクト5g、塩化ナトリウム5g、pH7.2）に植菌し、さらに30℃で8時間培養した。次いで、その培養物を新たなLB液体培地2リットルに添加し、37℃で一昼夜（18時間）培養した。培養後、菌体と培養液を低速遠心分離（5000 \times g）によって分離した。菌体および培養液はともに発現した組換えアポイクオリンを含むためそれぞれ保存し、イクオリンの精製出発材料とした。

【0087】

2) 培養菌体からのイクオリンの精製

集菌した菌体を、還元剤であるジチオスレイトール（DTT, 和光純薬社製）200mgを含む400mlの50mM Tris-HCl、10mM EDTA、pH7.6の緩衝液中に懸濁させ、氷冷下において超音波破碎装置で2分間処理して菌体を破碎し、12000 \times gで20分間遠心後、上澄み液を集めた。得られた上澄み液に化学合成したセレンテラジンを産生アポイクオリンの1.2倍のモル濃度になるように少量のメタノールに溶かしこみ、4℃で5時間以上放置した。この上澄み液を直ちに、20mM Tris-HCl、10mM EDTA、pH7.6の緩衝液で平衡化したQ-セファロースカラム（ファルマシア製、直径2cm \times 10cm）に添加してイクオリンを吸着させ、カラムから溶液の280nmでの吸光度が0.05以下になるまで20mM Tris-HCl、10mM EDTA、0.1M NaCl、pH7.6で

カラムを洗浄した。そして、カラムに吸着したアポイクオリンとイクオリン画分を 0.1 M-NaCl ~ 0.4 M-NaCl の直線濃度勾配で溶出させた。

【0088】

再生イクオリンと未再生のアポイクオリンとの分離は、疎水性クロマトグラフィーであるブチルセファロース 4 ファーストフローゲルを用いて行った。即ち、Q-セファロースカラムからのオレンジ色の溶出液を、硫酸アンモニウムの最終濃度が 2 M になるように調整した。次いで、不溶画分を遠心分離によって除去し、その上澄み液を、2 M-硫酸アンモニウムを含有する 20 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、pH 7.6 で平衡化したブチルセファロース 4 ファーストフローカラム（ファルマシア社、カラムサイズ：直径 2 cm × 8 cm）に通し、硫酸アンモニウム濃度 1 M まで直線濃度勾配により溶出し、発光活性を有するオレンジ色の再生イクオリン画分を収集した。

【0089】

一方、未再生のアポイクオリンは、20 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、pH 7.6 でのみ溶出された。再生イクオリン画分について、還元状態で 12 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE による分析を行った。その結果、精製画分について分子量 25 kDa 蛋白質に相当する単一バンドが検出され、その純度はデンスitometer での測定では 98 % 以上であった。菌体からのイクオリンの回収率は約 80 % で、80 mg の高純度イクオリンを得た。

【0090】

3) 培養液からのイクオリンの精製

培養液からの高純度アポイクオリンの精製は、特開平 1-132397 号公報に記載の方法に従って実施した。即ち、培養液を酸性化処理して pH 5 以下にし、4℃で 60 分間以上放置した。白色沈殿となったアポイクオリンを遠心分離によって単離し、これを還元剤を含む上述の緩衝液に溶解させた。そして菌体からのイクオリンの精製工程と同様にイクオリンへの再生後、Q-セファロースカラムクロマト法、ブチルセファロース 4 ファーストフローカラムクロマト法を用いて、純度 98 % 以上のイクオリンを取得した。得られた精製イクオリンについて、還元状態で 12 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE による分

析を行った結果、分子量 25 kDa 蛋白質に相当する単一バンドが検出され、その純度はデンスイターでの測定では 98% 以上であった。培養液より得られたアポイクオリン 50 mg から高純度イクオリン 45 mg を得た。蛋白濃度は、精製蛋白質濃度は Bradford 法にもとづく市販のキット（バイオラッド社製）を用い、ウシ血清アルブミン（ピアス社製）を標準物質として用いて決定した。

【0091】

実施例 2 発光活性を有する蛍光蛋白質の調製

実施例 1 記載の精製イクオリンを出発原料として、10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、2 mM EDTA、1.2 M 硫酸アンモニウムを含む緩衝液で、イクオリン濃度が 8 mg/ml のイクオリン溶液を調製した。

このイクオリン溶液 1 ml を、高速限外濾過フィルターである分画分子量 10,000 のポリエーテルスルホン膜を有するビバスピニン 2 カラム（ザルトリウス社製）を用いて、冷却高速遠心機（日立社製：CR20B2 型）にて、4℃で、5000 × g、60 分間以上遠心を行い、全量を 0.1 ml 以下に濃縮した。さらに、濃縮溶液の EDTA 濃度を、0.1 μM 以下に下げるために、1 ml の 0.1 μM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl をビバスピニン 2 カラムに加え、再度同一条件で遠心を行い、全量を濃縮した。このステップを最低 2 回くり返し、濃縮溶液中の EDTA の濃度を 0.1 μM 以下に押さえた。このイクオリン濃縮液は、黄赤色を呈し、肉眼で容易に確認できた。

【0092】

発光活性を有する蛍光蛋白質を調製するために、以下の手順で行った。ビバスピニン 2 カラム内で濃縮イクオリン溶液に、0.9 ml の 5 mM 塩化カルシウム（和光純薬）、2 mM ジチオスレイトール（和光純薬）を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) を重層し、連続発光を開始し、4℃で 24 時間以上放置する。発光反応の終了は、イクオリン溶液の黄赤色の消失によっても確認できた。さらに、ビバスピニン 2 カラム内へ 2 ml の 5 mM 塩化カルシウム（和光純薬）、2 mM ジチオスレイトール（和光純薬）を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) を加え、上記同一条件で遠心を行い洗浄した。生成した発光活性を有する蛍光蛋白質は、長波長の UV ランプ（極大波長 = 366 nm）の下で、青色蛍光を発生することを確認した。

【0093】

実施例3 発光活性を有する蛍光蛋白質から緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の調製

実施例2で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質から、カルシウムをEDTAで取り除くことで緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質を調製した。すなわち、ビバスピン2カラム内の実施例2で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質へ、10mM EDTAを含む50mM Tris-HCl (pH 7.6)を2ml加え、上記同一条件で遠心を行った。操作を3回くり返した。長波長のUVランプ(極大波長=366nm)の下で、生成物が緑色蛍光を発生することを確認した。蛋白量の回収率は、定量的であった。

【0094】

生成物から余剰のEDTA溶液を除く為には、50mM Tris-HCl (pH 7.6)を2ml加え、上記同一条件で遠心を行った。操作を5回くりかえすことにより余剰のEDTAが除去された。

【0095】

実施例4 緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質から発光活性を有する蛍光蛋白質の調製

実施例3で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質に過剰のカルシウムイオンを含む溶液を加えることにより、実施例2で調製したと同じ発光活性を有する蛍光蛋白質を調製した。具体的には、実施例3で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の溶液0.5ml (0.25mg/ml)に、室温で、0.1Mの塩化カルシウムを少量ずつ添加し、試料溶液のカルシウムイオンの最終濃度が5mMになるように調製した。発光活性を有する蛍光蛋白質の生成は、その蛍光スペクトル最大吸収値(335nmで励起)459nmにおける蛍光強度の増加と、緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の蛍光スペクトル最大吸収値(335nmで励起)467nmにおける蛍光強度の減少により確認した。過剰なカルシウムイオンを除去するため、生成物の溶液をビバスピン2カラムに移し、2mlの50mM Tris-HCl (pH 7.6)を用いて、冷却高速遠心機(日立社製:CR20B2型)にて、4℃で、5000×g、60分間以上遠心を行い、全量を0.1ml以下に濃縮した。この操作を3回くり返す

ことにより過剰なカルシウムイオンは除去された。

【0096】

実施例 5 分光学的測定：吸収／蛍光スペクトルの測定および蛍光量子収率の測定

吸収スペクトルは、既知濃度の発光活性を有する蛍光蛋白質（実施例 2 で調製）および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質（実施例 3 で調製）を光路長 10 mm の石英セルに移し、スペクトロフォトメーター（日本分光社製；V-560 型）を用いて測定を行った。測定条件は、バンドパス 1.0 nm、レスポンス medium、スキャンスピード 200 nm/min、22～25℃である。

蛍光スペクトルは、既知濃度の発光活性を有する蛍光蛋白質および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質を光路長 10 mm の無蛍光石英セルに移し、蛍光測定装置（日本分光社製、FP-777W）で測定した。測定条件は、バンドパス：1.5 nm、レスポンス：0.5 sec、スキャンスピード：60 nm/min、22～25℃である。蛍光スペクトルの補正は、蛍光測定装置に使用法に従っておこなった。蛍光量子収率は、0.1 M 硫酸中のキニン硫酸（和光純薬）を標品として、335 nm 励起時の蛍光収率を 0.55 として算出した。その結果を、表 2 に示した。

【表 2】

表 2

スペクトル分析		発光活性を有する 蛍光蛋白質	緑色蛍光を発生する 蛍光蛋白質
吸収スペクトル			
吸収極大値 (λ_{\max} nm)		281,336	282,336
吸光度 0.1 mL% 溶液	280 nm	2.80	2.82
	335 nm	0.65	0.56
分子吸光係数 ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	280 nm	60.8×10^3	61.2×10^3
	335 nm	14.1×10^3	12.2×10^3
蛍光スペクトル			
蛍光極大値 (λ_{\max} nm、335 nm 励起)		459	467
蛍光スペクトルの半値幅 (nm)		83.5	89.2
蛍光量子収量		0.079	0.073

【0097】

実施例 6 蛍光発色団の同定

実施例 2 で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質および実施例 3 で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質に含まれる蛍光の発色団の同定は、それぞれの蛋白

質から発色団を有する化合物（セレンテラミド）をメタノールで抽出し、TLC、UV、質量分析等で行った。すなわち、蛋白質溶液（0.26 mg/0.1 ml）に 0.9 ml のメタノールを加え、95℃で3分間加熱する。冷却後、遠心分離（12000×g、5分）により、メタノール抽出フラクションを得て、分析に供した。標準サンプルとして、化学合成したセレンレラミド標品およびセレンテラミン標品を用い、TLC法により、メタノール抽出画分中に、セレンレラミドの存在を確認した。TLCゲルは、シリカゲル 60 F-254（メルク社製）を用い、展開溶媒はエチルアセテート：クロロホルム（2：1）を用いた。UVランプ下での、セレンレラミドのR_f値は0.5、セレンテラミンのR_f値は0.6であった。メタノール抽出フラクションに含まれる発色団は、そのR_f値からセレンテラミドであることが確認された。吸収スペクトルの吸収極大波長は、278 nm、294 nm、333 nmであり、蛍光スペクトルの吸収極大波長は、335 nmでの励起では、428 nmであった。これは、合成標品であるセレンレラミドと一致した。

【0098】

E SI-TOF 質量分析を行い、 $m/z = 412.36$ （セレンテラミドの計算値 $[M+H]^+ = 412.45$ ）の測定値を得た。以上の結果から、発光活性を有する蛍光蛋白質および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質に含まれる蛍光の発色団は、セレンテラジンの酸化物であるセレンテラミドと決定した。

このことから、セレンテラミドの335 nmにおける分子吸光係数 $16.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて、発光活性を有する蛍光蛋白質および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質に含まれるセレンテラミドの濃度を計算すると、アポイクオリン蛋白質の95%以上に、セレンテラミドが存在する。すなわち、発光活性を有する蛍光蛋白質および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質はアポイクオリン蛋白質の一分子にセレンテラミド一分子がほぼ1：1の比で、非共有結合型で存在することが明らかになった。

【0099】

実施例 7 質量分析

実施例 2 で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質および実施例 3 で調製した緑

色蛍光を発生する蛍光蛋白質の質量分析を、Matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)法で、Voyager DE Pro mass spectrometer(PerSeptive Biosystem社)により行った。分子量のスタンダードとして、アンジオテンシン I (m/z 1296.69)、インシュリン (m/z 5734.59)、アポミオグロビン (m/z 16952.60)、アポイクオリン (m/z 2163.20)を用いた。マトリックスはシナピン酸(アルドリッチ社製)を用いた。測定の結果、分子量 21632 ± 5 の測定値を得たことより、アポイクオリンには、特別な修飾、例えば脱炭酸や脱水、の反応は蛍光蛋白調製過程では起きていない事が確認された。

【0100】

実施例 8 カルシウム添加による蛍光スペクトルの変化

実施例 2 で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質および実施例 3 で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の蛍光スペクトルを図 1 に示した。図 1 中、実線が発光活性を有する蛍光蛋白質のものであり、点線が緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質のものである。

この蛍光スペクトル変化は可逆的であり、蛍光スペクトルの差スペクトルを利用すれば、カルシウムイオンの定性、定量が可能となる。すなわち、緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質へ、既知の濃度のカルシウムを添加し、任意の波長での蛍光強度の標準曲線を作製することができる。カルシウム濃度が未知の検体での測定値を標準曲線と対比してその濃度を測定できる。

【0101】

実施例 9 発光活性を有する蛍光蛋白質の蛍光強度の温度依存性

実施例 2 で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質の蛍光発生強度の温度依存性を測定した。サンプル(蛋白質濃度 0.025 mg/ml)を 4°C 、 25°C 、 37°C 、 40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 、 65°C の各温度で 10 分間保温後、 335 nm での励起による蛍光発生強度を測定した。 4°C における蛍光発生強度を基準として、 25°C 、 37°C 、 40°C での蛍光発生強度の相対%値は、100であった。 45°C では 10 であり、 50°C 以上では 0 であった。測定直後に、氷冷上に 10 分間以上放置し、それぞれ蛍光発生強度を再測定した。その結果、すべてもと

の強度に回復した。蛍光強度の半分になる温度は43℃であると算出された。40℃以下においては、発光活性を有する蛍光蛋白質の構造は変化することなく熱安定性を示す。また、40℃を超える温度での加熱によって発光活性を有する蛍光蛋白質の構造は変化して、蛍光発生能が低下し、または失われる。しかし、一旦低下または失われた蛍光発生能が冷却することで回復することが確認された。すなわち、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は発光能回復性を示すことが明らかになった。

【0102】

実施例10 発光活性を有する蛍光蛋白質の発光能回復性

実施例2で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質および実施例3で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の熱安定性を比較した。それぞれ、蛋白質濃度0.26mg/mlの発光活性を有する蛍光蛋白質および緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質を含む溶液を、90℃で3分間加熱し、24℃に放置後、それぞれの蛍光発生強度を蛍光測定装置で測定した。その結果を図2に示した。

発光活性を有する蛍光蛋白質は、20分以内に93.0%の蛍光発生能が回復し、緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質は、20分以内に31.3%の蛍光発生能が回復した。一方、公知のカルシウム結合型発光蛋白質であるイクオリンのカルシウムイオンの添加による発光能は、該熱処理で完全に失われる。したがって、本発明の発光活性を有する蛍光蛋白質は、公知のカルシウム結合型発光蛋白質と比較して、熱安定性が非常に高いことが明らかとなった。

【0103】

実施例11 蛍光蛋白質の保存法

実施例2で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質および実施例3で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の溶液を、4℃および-80℃で保存し、実施例5の方法により、それぞれの蛍光発生強度からその蛍光発生能を測定した。その結果を表3に示した。両者とも蛍光発生能の95%は6ヶ月以上安定に保持され、安定化剤等不要で保存が可能であることが明らかとなった。

【表 3】

表 3 蛍光蛋白質の保存試験

	発光活性を有する蛍光蛋白質		緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質	
	459nmの蛍光強度(%)		467nmの蛍光強度(%)	
保存期間/温度	4℃	-80℃	4℃	-80℃
0ヶ月	100	100	100	100
6ヶ月	96	101	95	99

【0104】

実施例 12 緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質からカルシウム結合型発光蛋白質（イクオリン）の調製法

実施例 3 で調製した緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質の溶液に、発光基質セレンテラジンを加えることのみにより、発光能を持つイクオリンを調製することができた。具体的は、0.02mgの緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質および2mMのEDTAを含む0.1mlの50mM Tris-HCl (pH 7.6) に、メタノールに溶かした発光基質セレンテラジン0.002mgを、4℃、25℃、37℃において加えた。生成物（イクオリン）のカルシウムイオン添加による発光活性をインキュベーション時間を変えて測定した。同時に、還元剤である1mMジチオスレイトール(DTT)の添加の有無の影響も検討した。その結果を図3に示した。この結果から、4℃、25℃においては、還元剤である1mM DTTの添加なしに、効率良く緑色蛍光を発生する蛍光蛋白質からカルシウム結合型発光蛋白質(イクオリン)に変換できる。その変換収率は90%以上である。25℃での生成時間は、4℃の時より短かった。また、37℃では、還元剤である1mM DTTの添加により、約80%の変換が可能であった。

【0105】

従来から行われている、イクオリンをカルシウムで発光させた後、還元剤とセレンテラジンを用いてイクオリンを再生する場合は、4℃がもっとも効率がよく、通常37℃においてはほとんど再生できない。しかし、この方法によれば、還元剤を添加すれば37℃でもイクオリンの調製が可能であることが示された。

同様に、セレンテラジンの代わりに基質アナログ化合物であるe-セレンテラ

ジンを用いた場合でも、カルシウム添加による発光活性を有する e-イクオリンが調製できた。

【0106】

実施例 13 還元剤添加による発光活性を有する蛍光蛋白質の耐熱安定性の改善

実施例 3 で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質 ($0.25 \mu\text{g}$) を 5mM のジチオスレイトール (DTT) 含む $100 \mu\text{l}$ の 50mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.6$) に溶解し、 90°C で 3 分間保温し、直ちに氷水で冷却した。冷却されたサンプルにメタノールに溶解したセレンテラジン $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ を添加し、その発光をルミノメーター (アトー社製 AB-2200) で 1 分間測定し、最大発光強度 (I_{max}) の相対値として示した。その結果を表 4 にまとめた。明らかに、熱処理時に DTT が存在することにより、発光活性 (ルシフェラーゼ様作用) が安定化される。

【0107】

【表 4】

表 4 DTT の添加による発光活性の耐熱性化

実験番号	DTT 添加の有無	熱処理の有無	発光活性 rlu (%)
1	+	—	26888 (100)
2	+	+	24916 (93)
3	—	—	24670 (92)
4	—	+	16964 (63)

【0108】

実施例 14 還元剤添加による発光活性を有する蛍光蛋白質の発光活性の安定化

実施例 3 で調製された発光活性を有する蛍光蛋白質 ($0.25 \mu\text{g}$) を 5mM のジチオスレイトール (DTT) を含むもしくは含まない $100 \mu\text{l}$ の 50mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.6$) に溶解し、それぞれにセレンテラジン $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ を添加し、その発光をルミノメーター (アトー社製 AB-2200) で測定した。

その結果を表 5 にまとめた。3 分から 60 分間の反応において、それぞれの発光強度をモニターすると、DTT 無添加の場合の発光強度は、15 分以降に急激に低下する。一方、DTT 添加の場合には、顕著な発光強度の低下は著しく抑制

される。還元剤の添加による発光活性の低下阻止効果が明らかとなった。

【0109】

【表5】

表 5 DTTの添加による発光活性の安定化

反応時間 (分)	発光活性 rlu/sec	
	DTTの添加無し	DTTの添加有り
3	23321	31155
6	21983	45050
15	13653	46663
30	7014	43951
45	4173	42329
60	2129	40930

【0110】

実施例15 発光活性を有する蛍光蛋白質の発光反応速度の決定

5mMのジチオスレイトール (DTT) 含む100 μ lの50mM Tris-HCl (pH 7.6) に、セレンテラジンの最終濃度を2.36 μ Mから23.6 μ Mの間になるように溶解した。実施例3で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質 (0.25 μ g) を添加し、1分間での発光の初速をもちいて、ラインウエバーバーグプロット法で、最大反応速度 (V_{max}) を 1.32×10^8 rlu/min/mg 蛋白、 K_m 値を13.3 μ M と決定した。発光活性を有する蛍光蛋白質は、一般的な酵素の触媒能を示すことが確認された。

【0111】

実施例16 発光活性を有する蛍光蛋白質の基質特異性

実施例3で調製した発光活性を有する蛍光蛋白質 (0.25 μ g) を5mMのジチオスレイトール (DTT) を含む100 μ lの50mM Tris-HCl (pH 7.6) に溶解し、それぞれにセレンテラジンおよびその誘導体1 μ g/ μ lを添加し、定常反応状態 (10分後) におけるその発光をルミノメーター (アトー社製 AB-2200) で測定した。セレンテラジン基質アナログであるh-セレンテラジンがセレンテラ

ジンよりも良い発光基質になることが判明した。その結果を表6に示す。

【0112】

【表6】

表 6 基質特異性

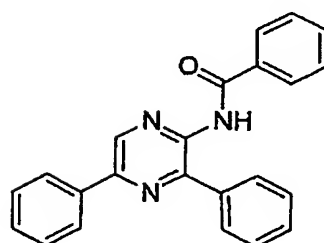
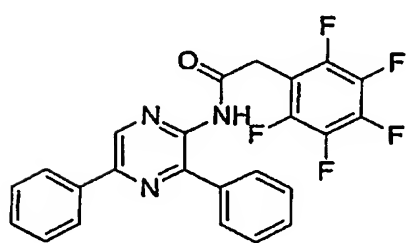
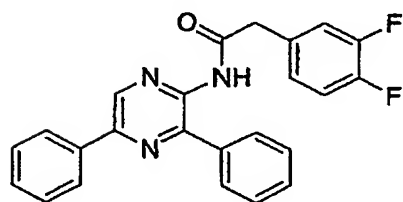
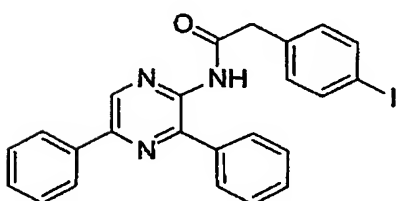
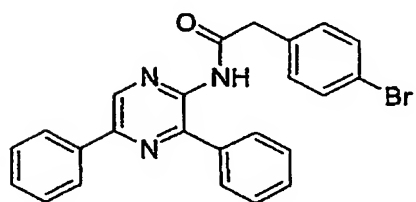
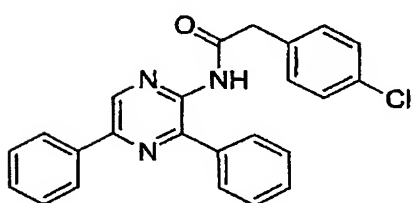
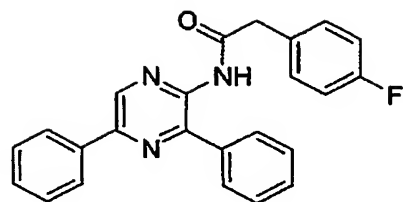
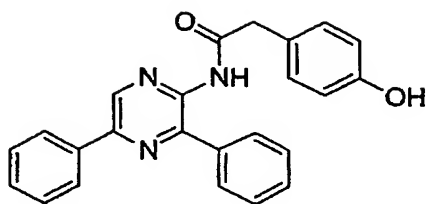
基質アナログ	発光活性 rlu/sec (%)	
セレンテラジン	53568	(100)
<i>h</i> -セレンテラジン	216844	(405)
<i>e</i> -セレンテラジン	989	(1.84)

【0113】

セレンテラミドまたはその類縁化合物として好ましい化合物を以下に記述する

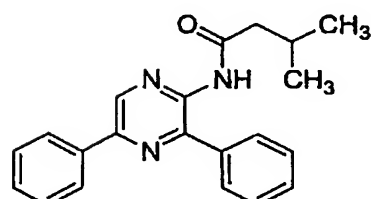
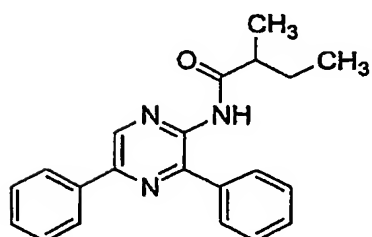
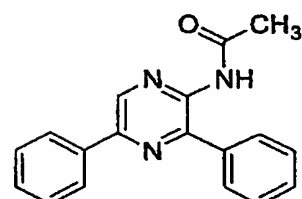
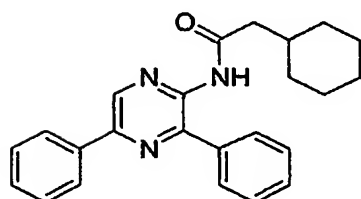
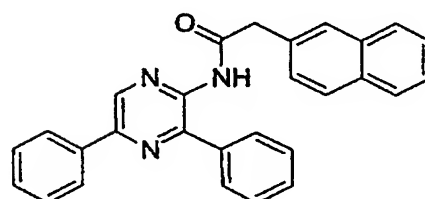
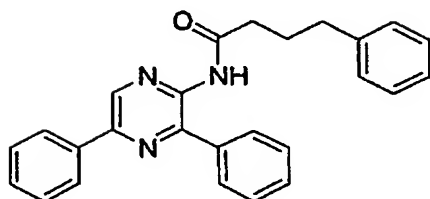
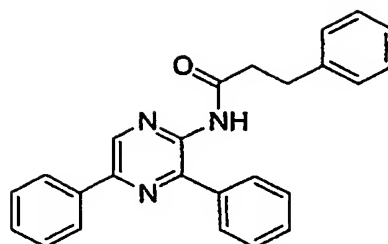
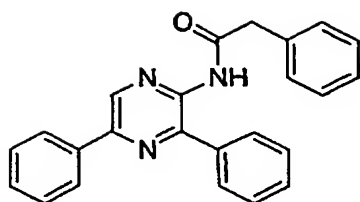
【0114】

【化15】



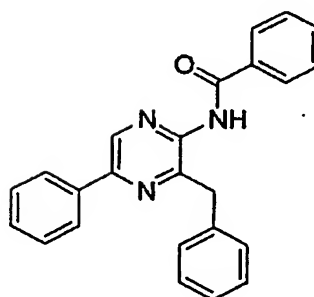
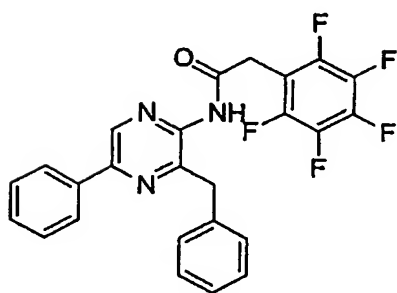
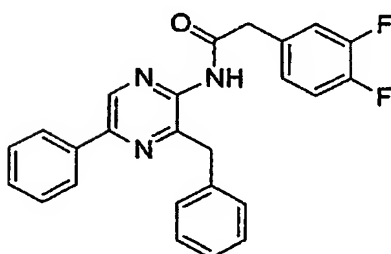
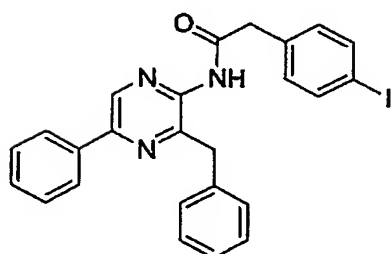
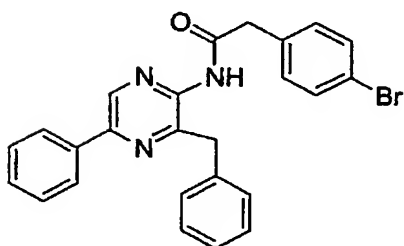
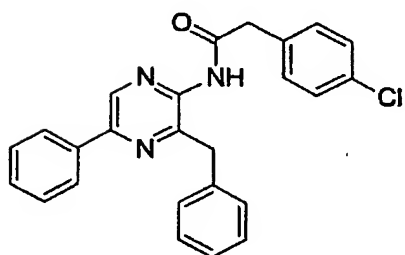
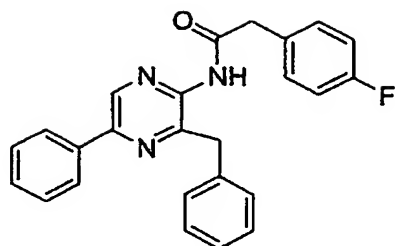
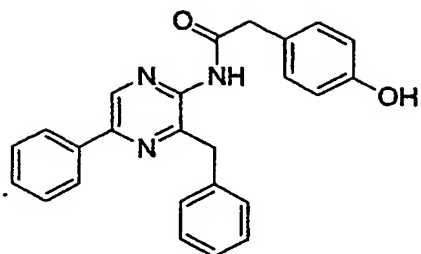
【0115】

【化16】



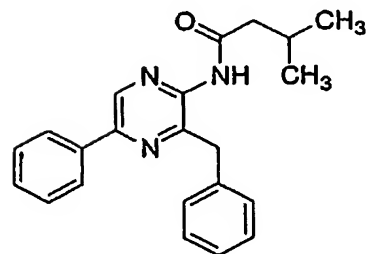
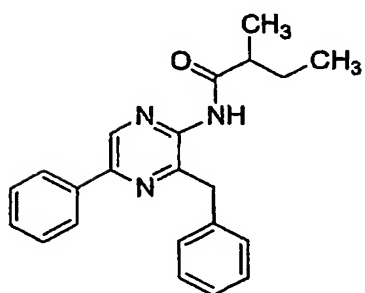
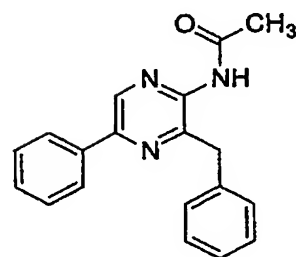
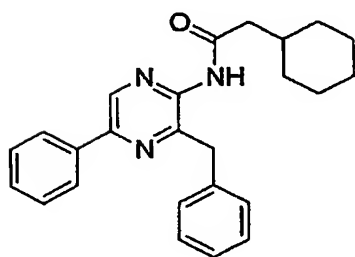
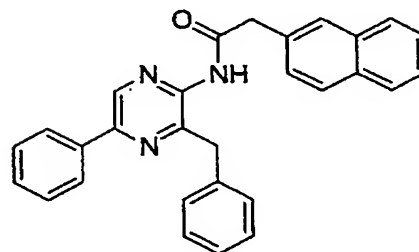
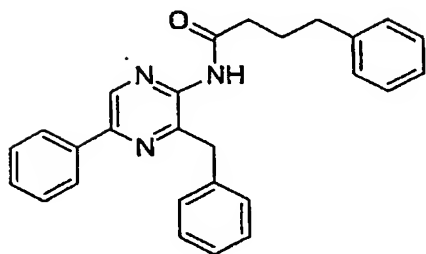
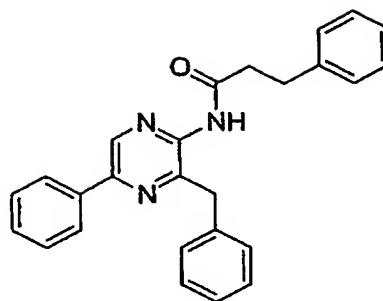
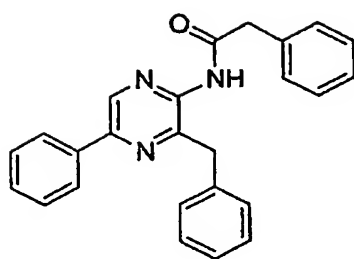
【0116】

【化17】



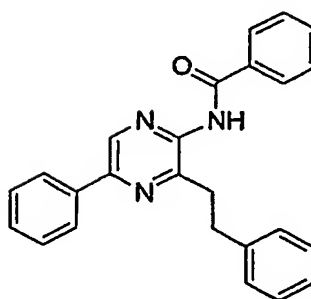
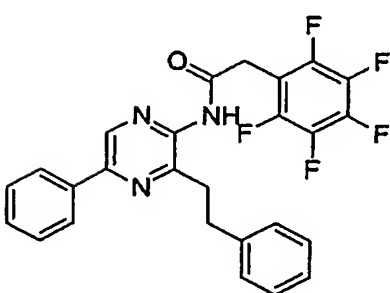
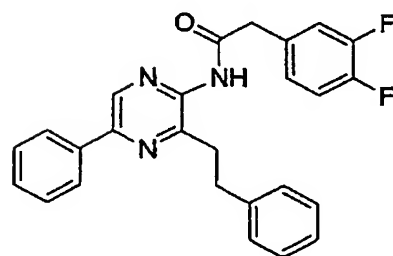
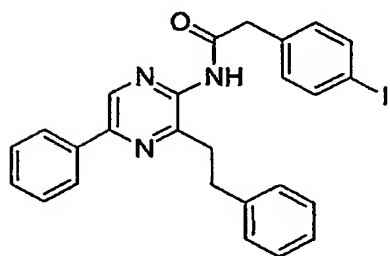
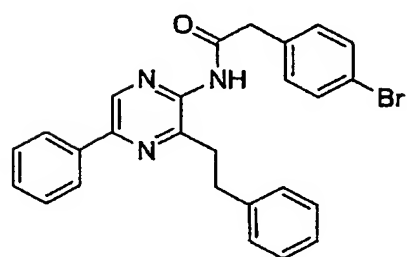
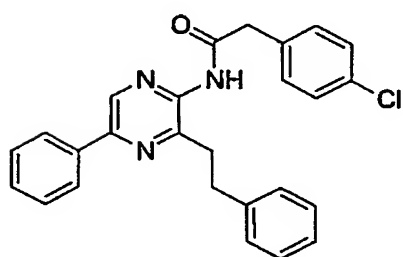
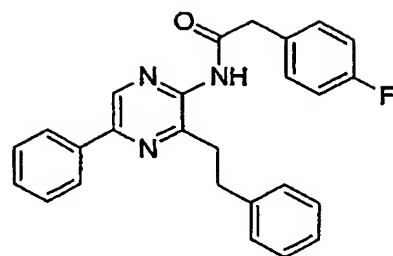
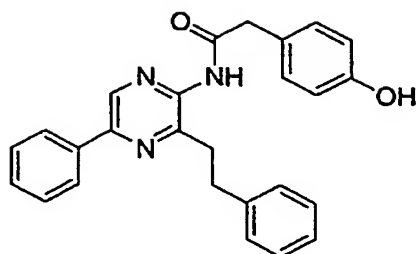
【0117】

【化 18】



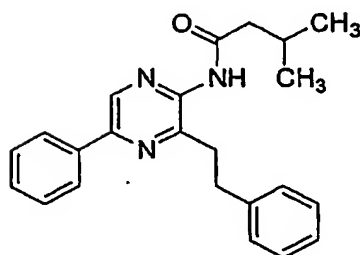
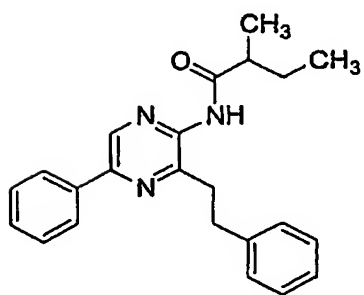
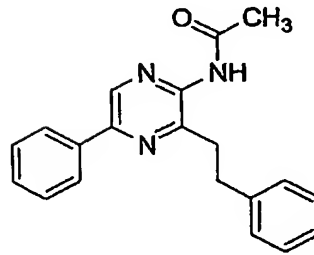
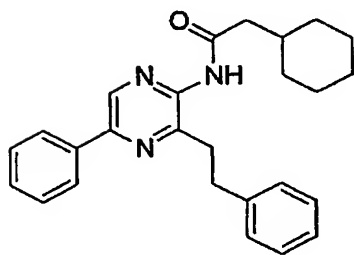
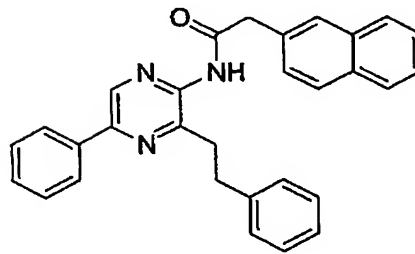
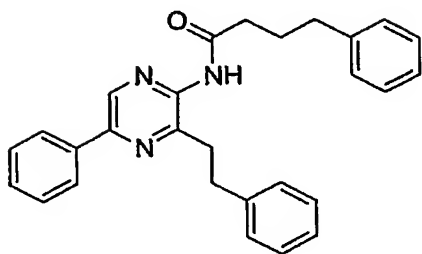
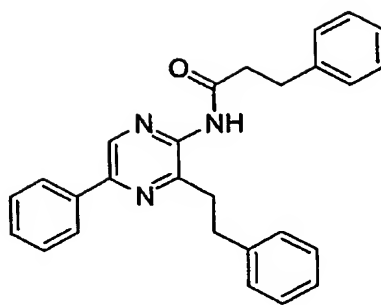
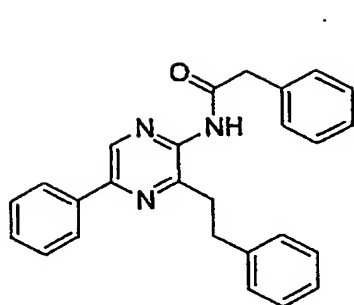
【0118】

【化19】



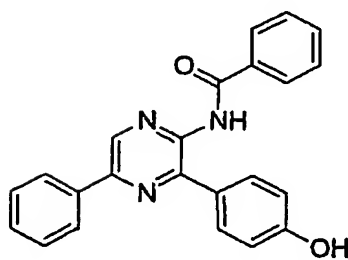
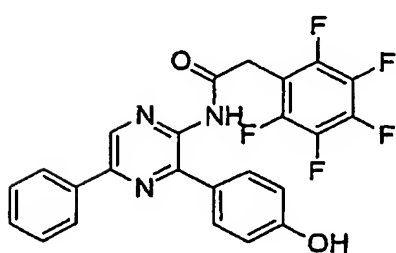
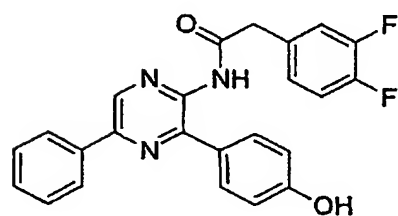
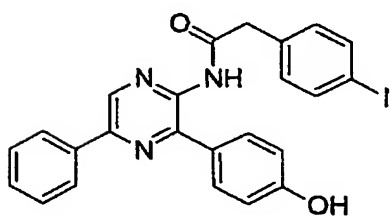
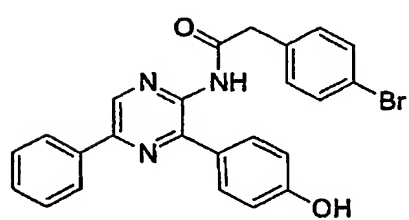
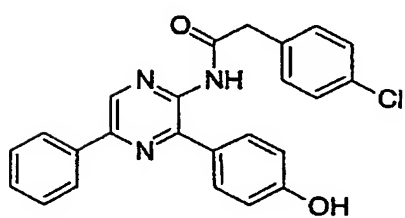
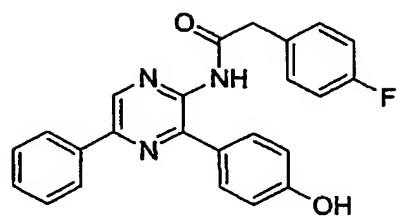
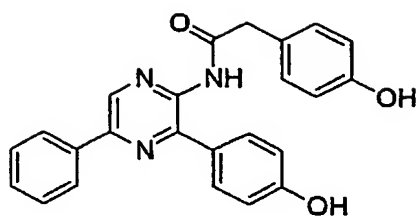
【0119】

【化 20】



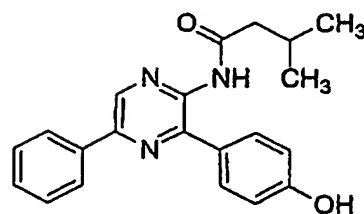
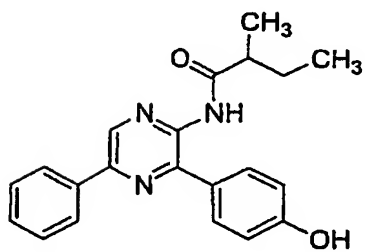
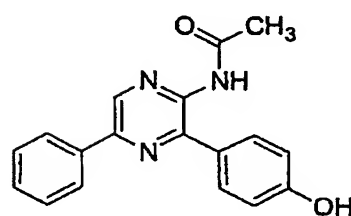
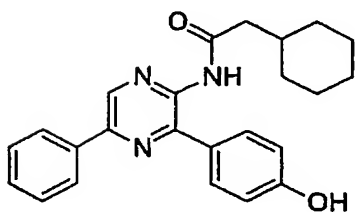
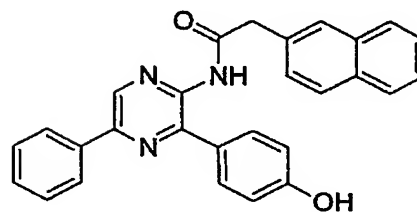
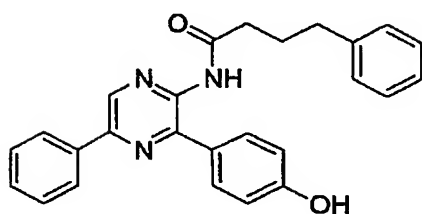
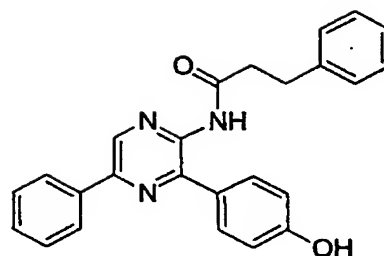
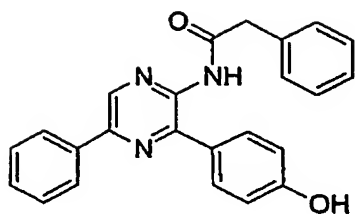
【0120】

【化 21】



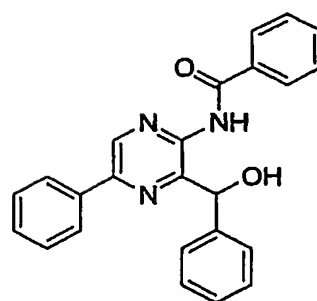
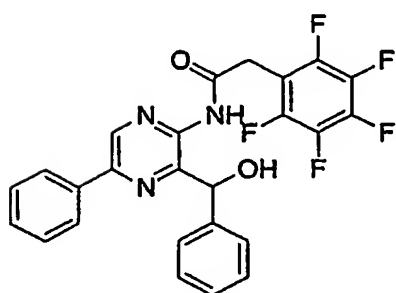
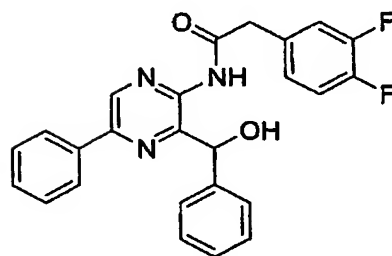
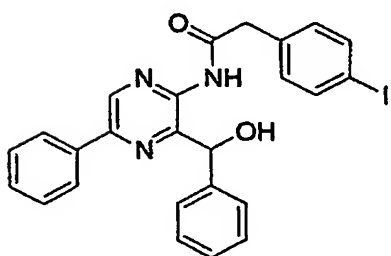
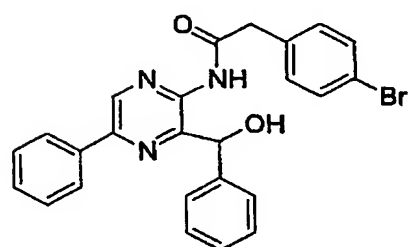
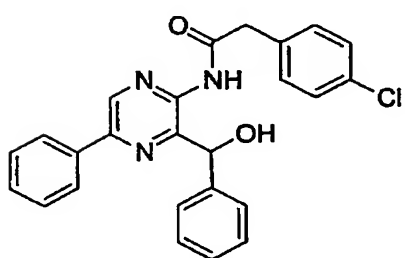
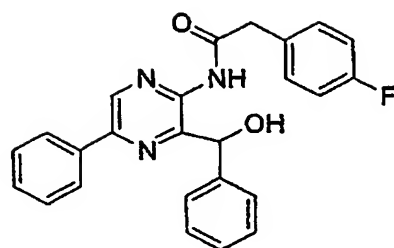
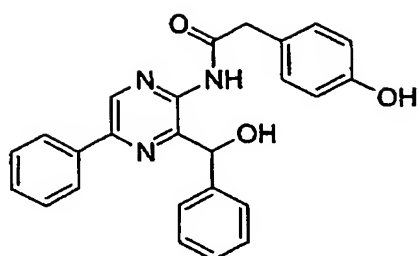
【0121】

【化 2 2】



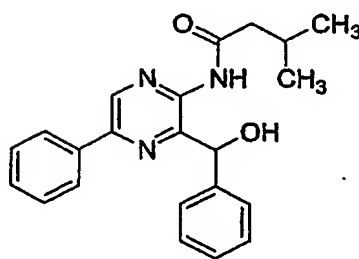
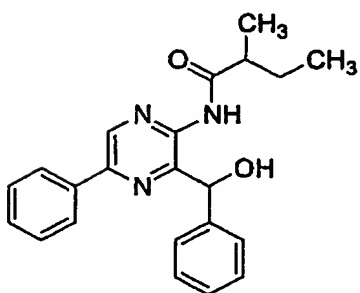
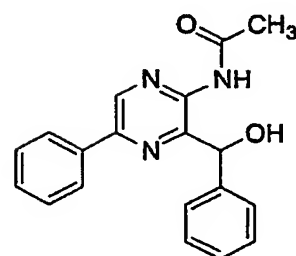
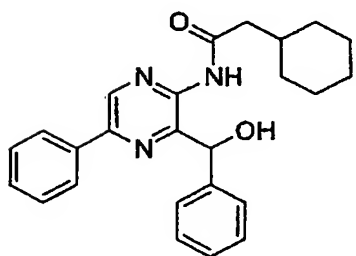
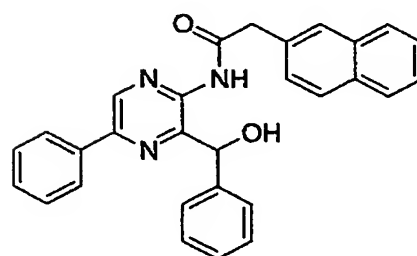
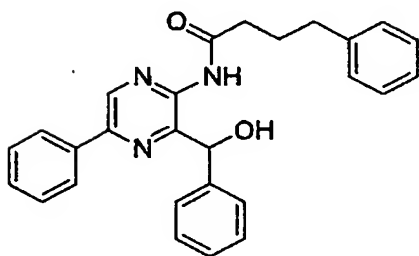
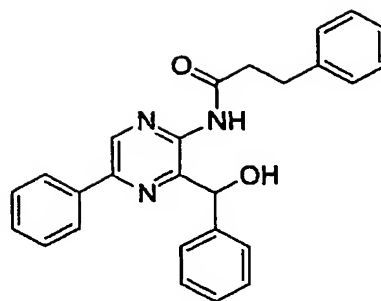
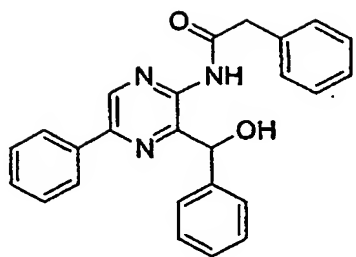
【0 1 2 2】

【化 23】



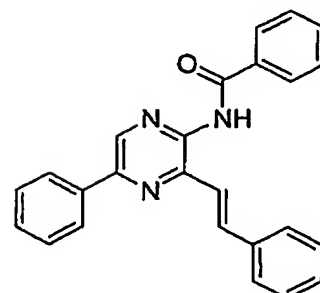
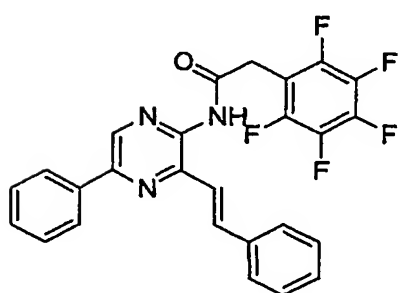
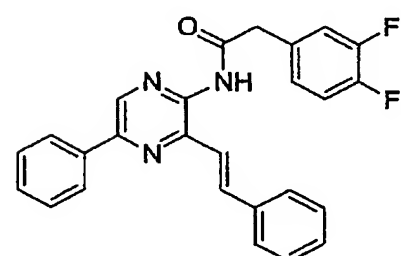
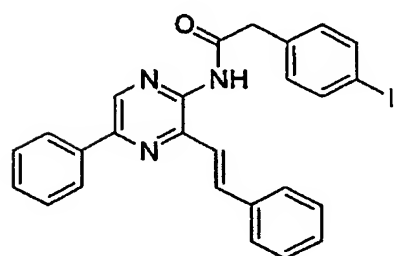
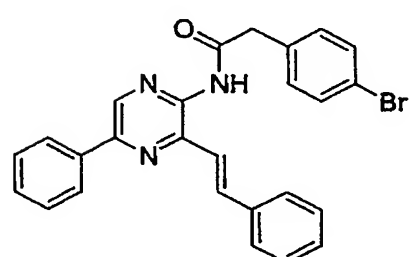
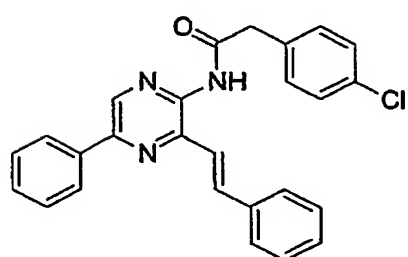
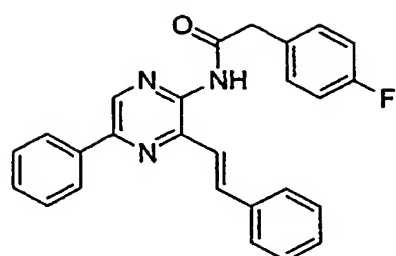
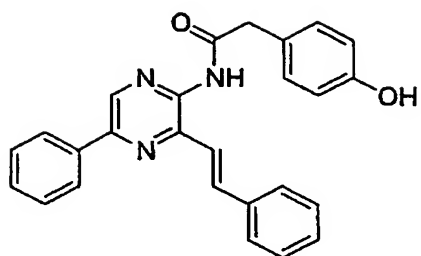
【0123】

【化 24】



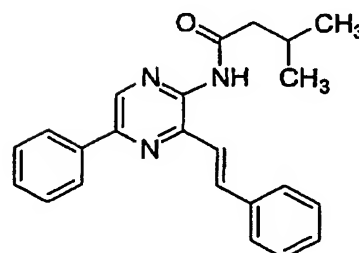
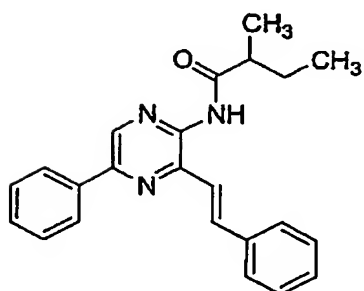
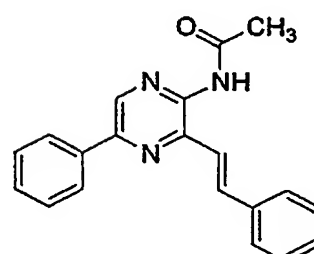
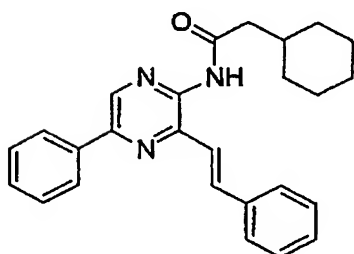
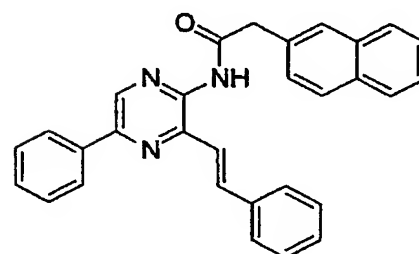
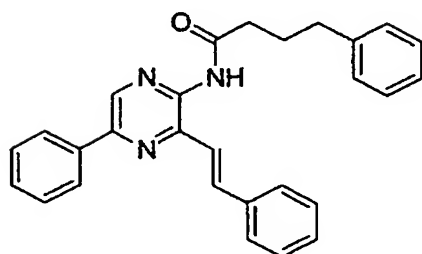
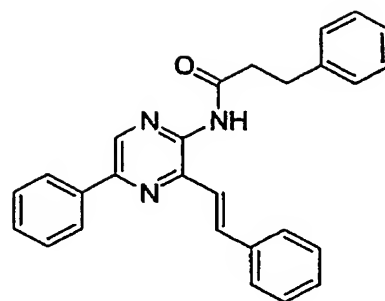
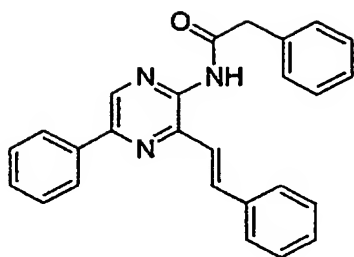
【0124】

【化 25】



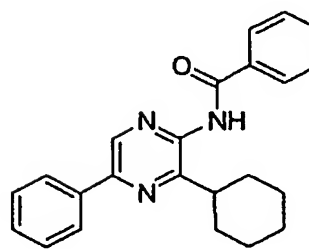
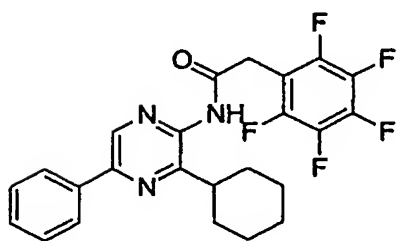
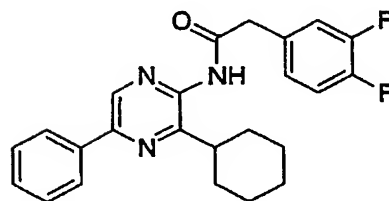
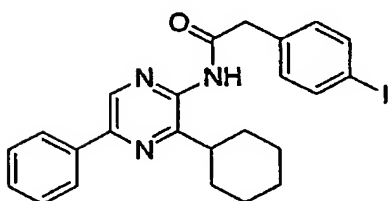
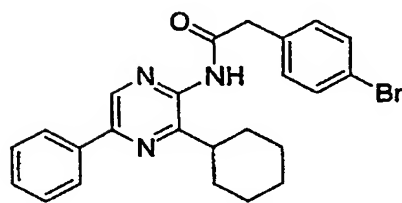
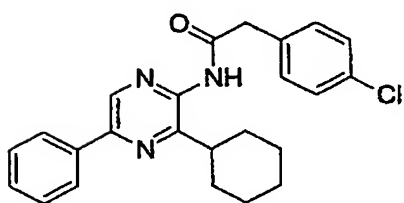
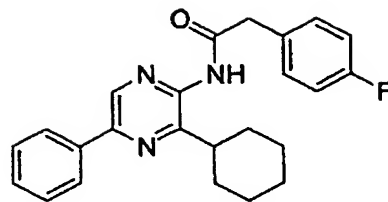
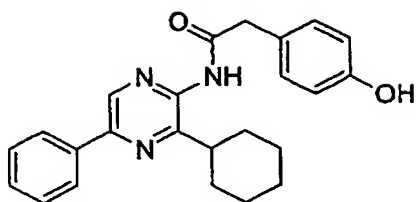
【0125】

【化 26】



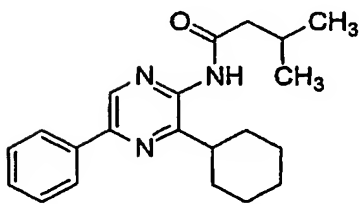
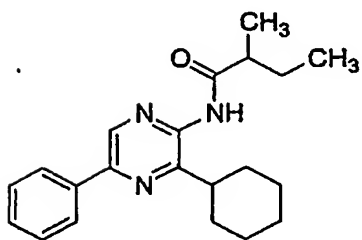
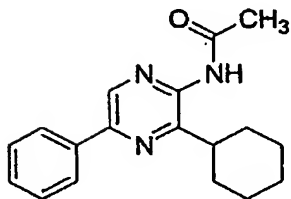
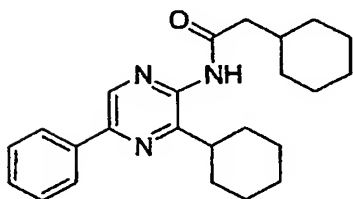
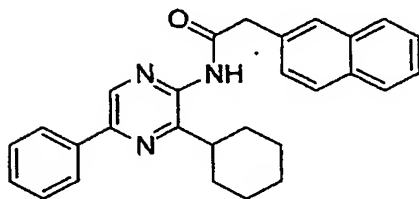
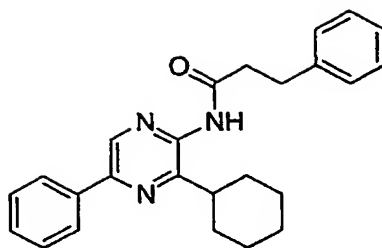
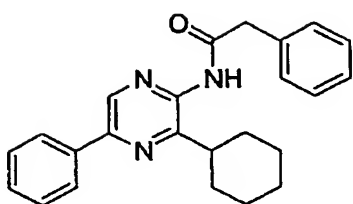
【0126】

【化 27】



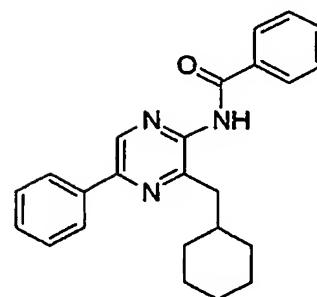
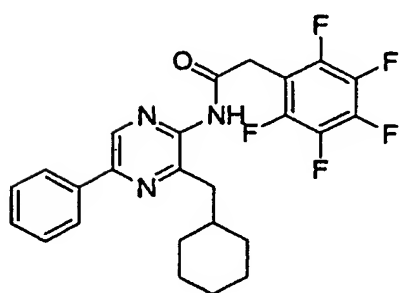
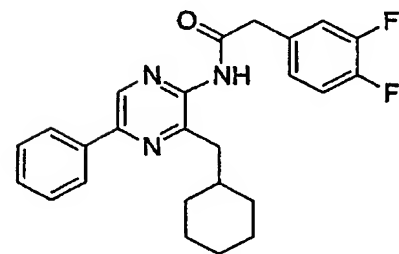
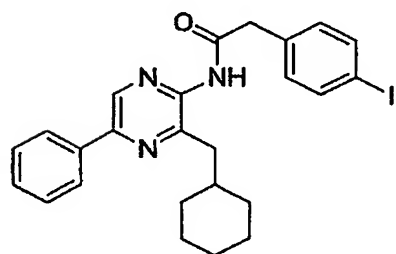
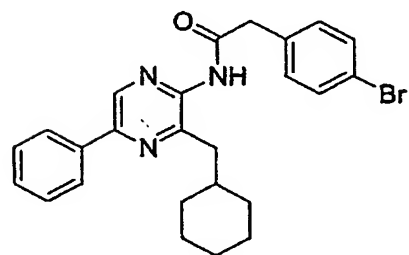
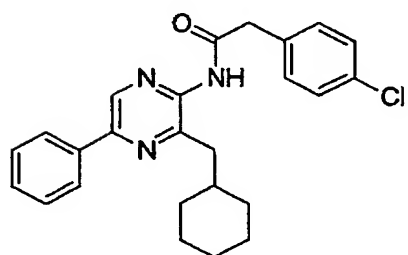
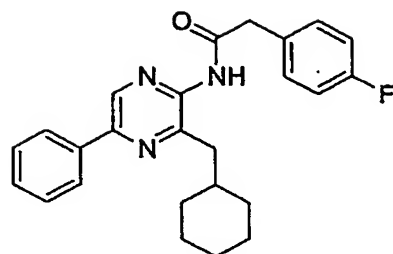
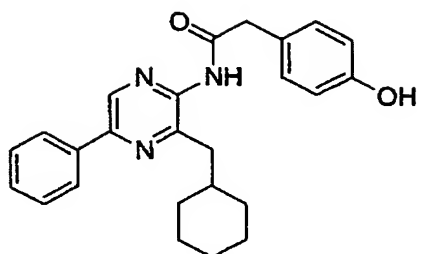
【0127】

【化 28】



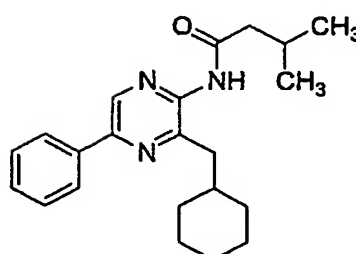
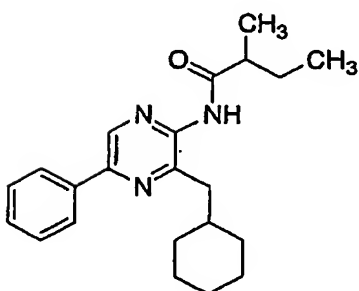
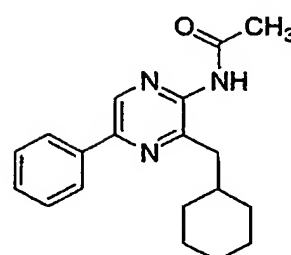
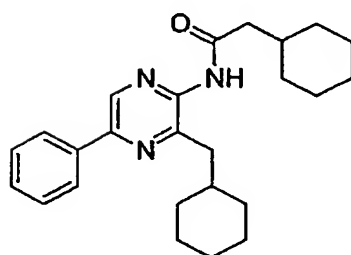
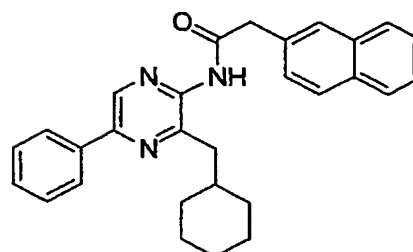
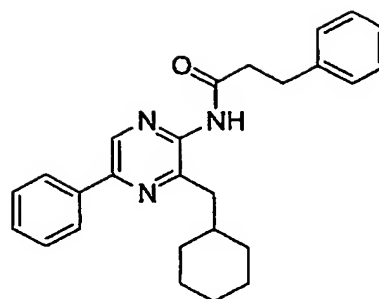
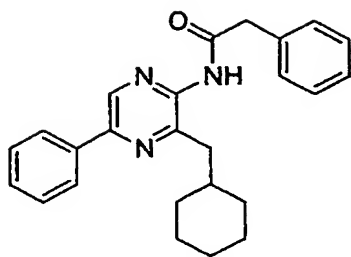
【0128】

【化 29】



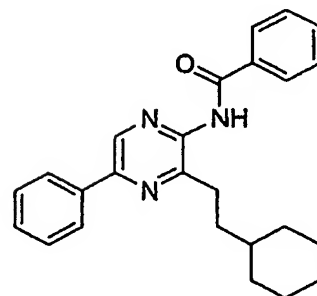
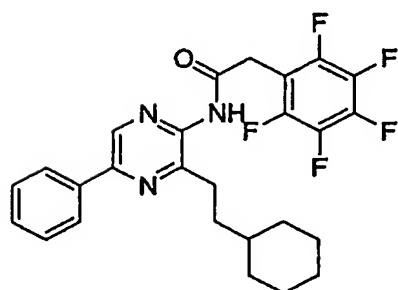
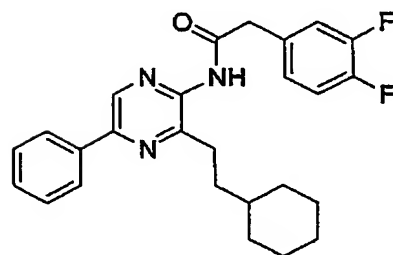
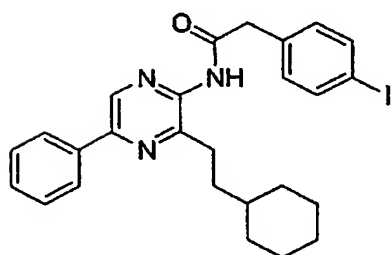
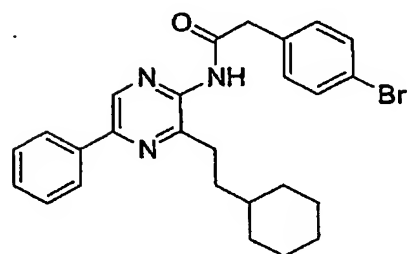
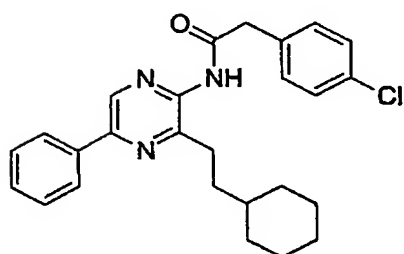
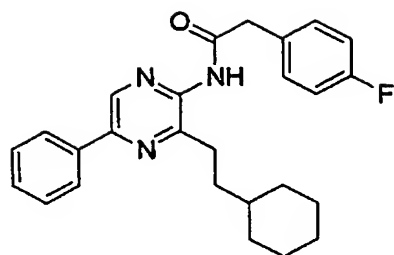
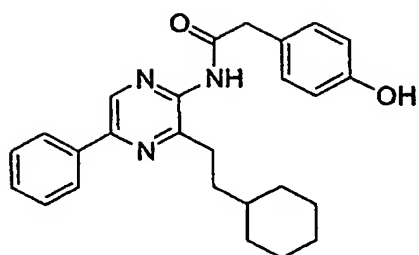
【0129】

【化 30】



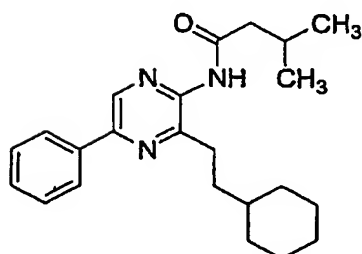
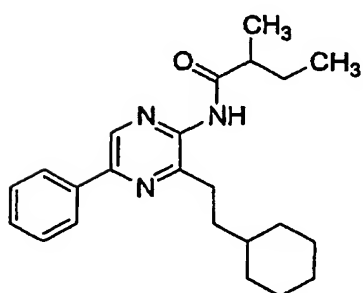
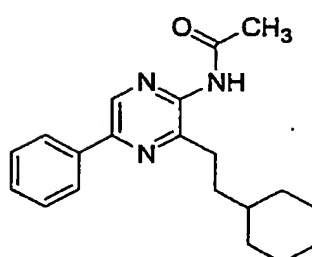
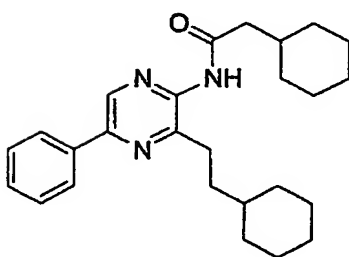
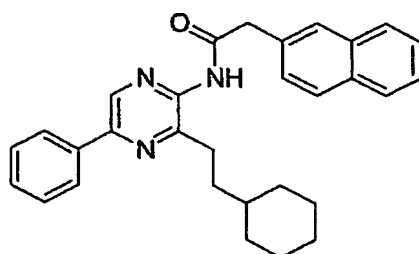
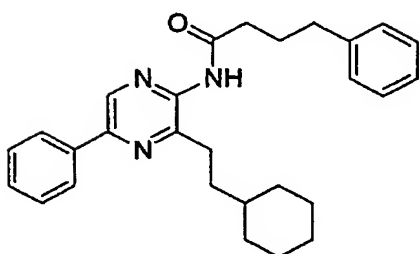
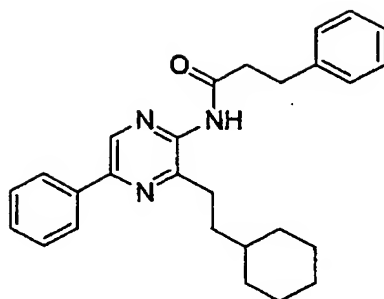
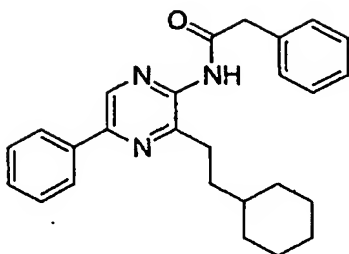
【0130】

【化31】



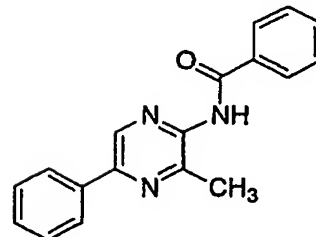
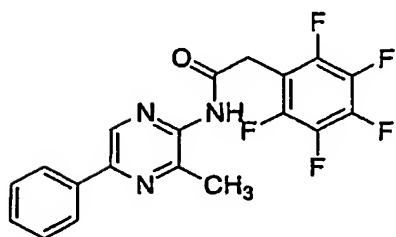
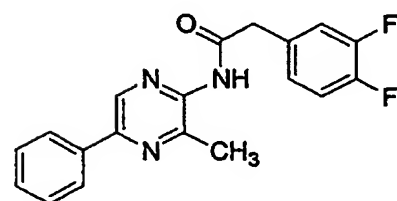
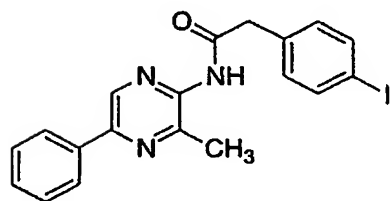
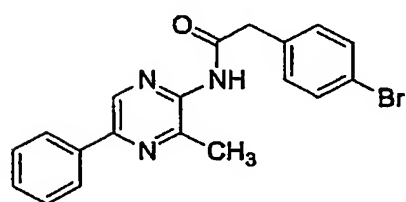
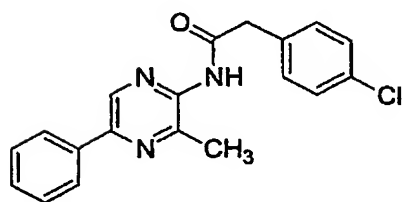
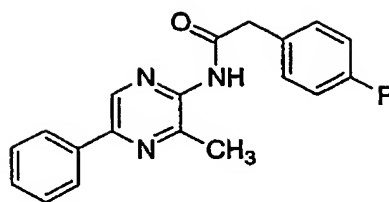
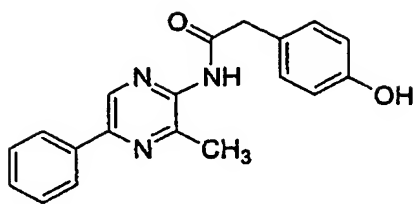
【0131】

【化32】



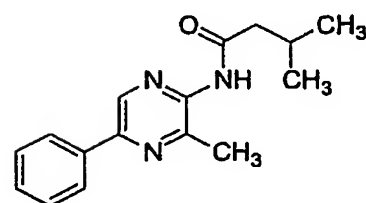
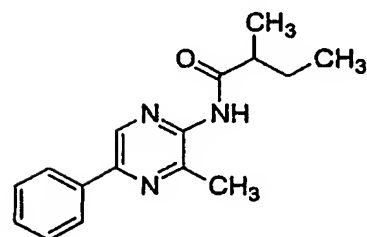
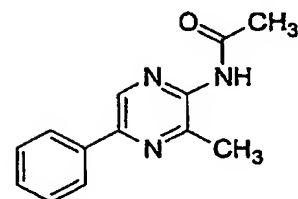
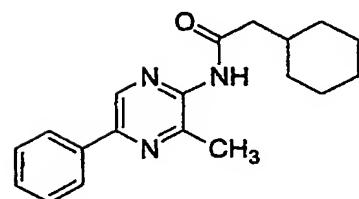
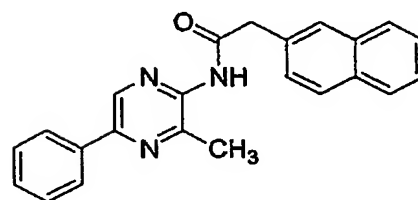
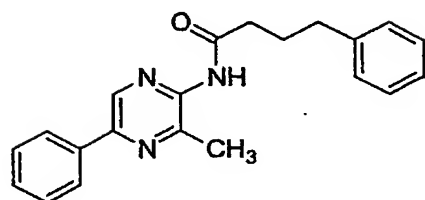
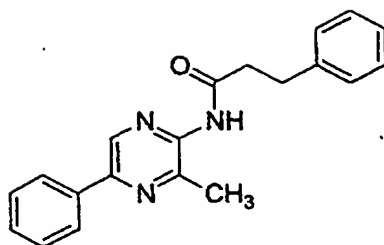
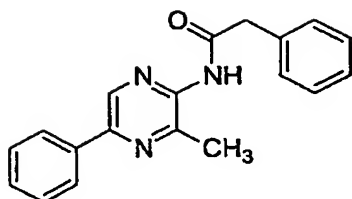
【0132】

【化33】



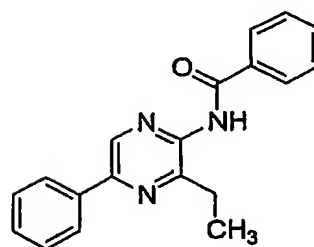
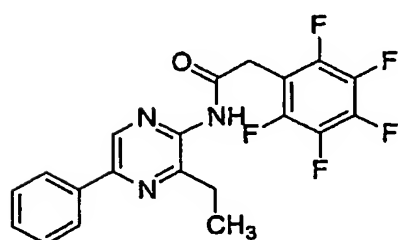
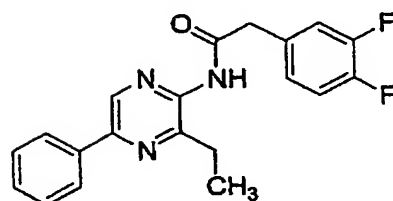
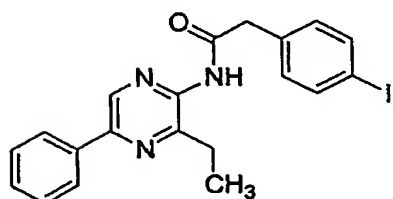
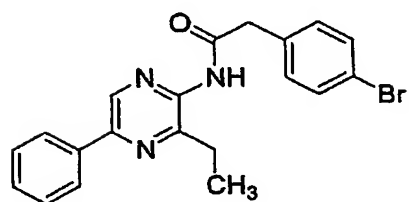
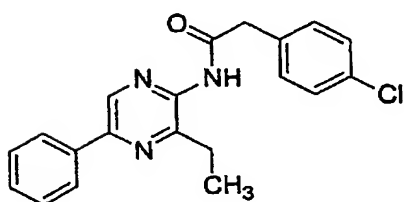
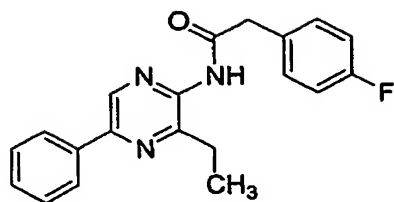
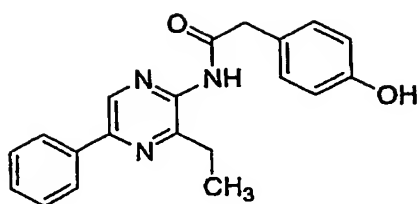
【0133】

【化 3 4】



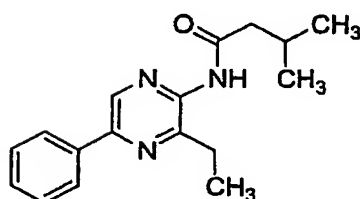
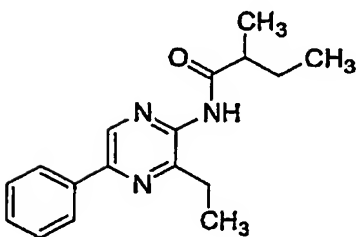
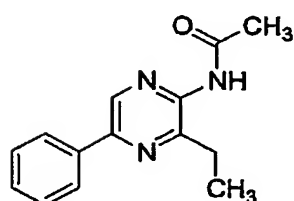
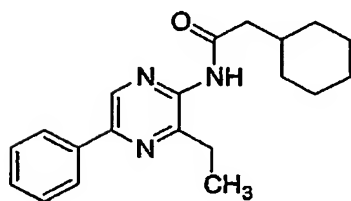
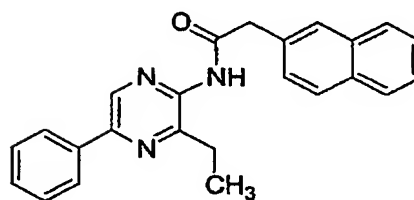
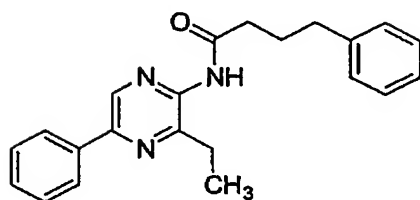
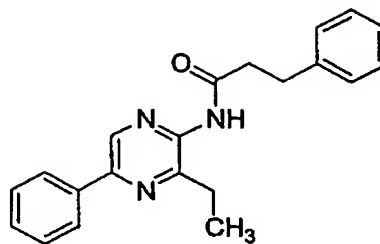
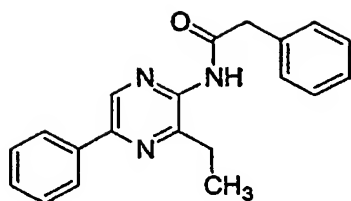
【0134】

【化 35】



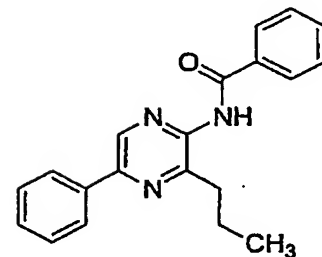
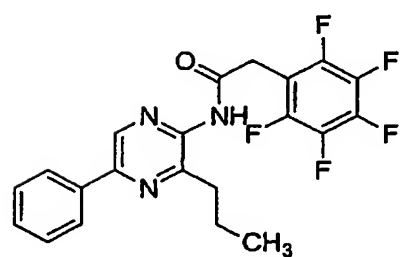
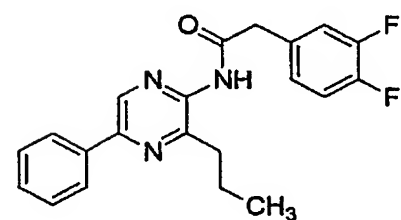
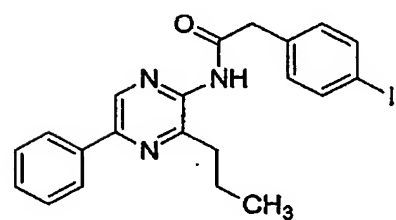
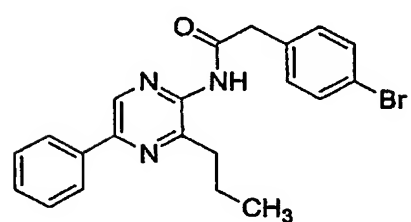
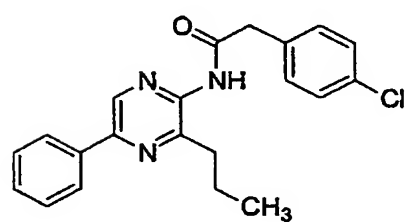
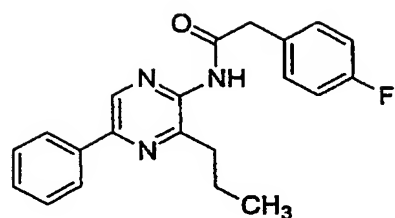
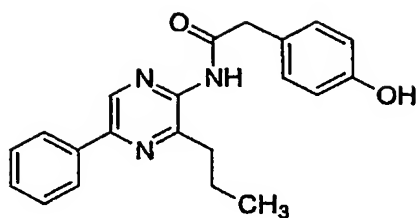
【0135】

【化 36】



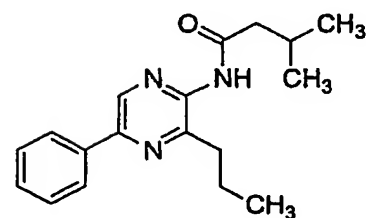
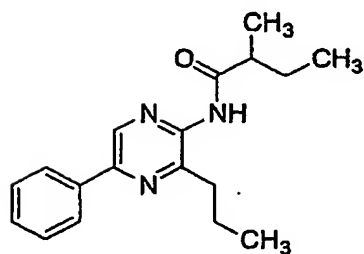
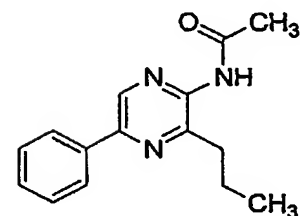
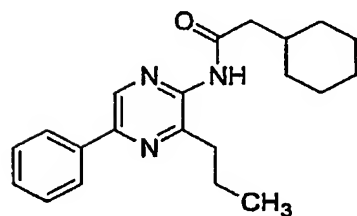
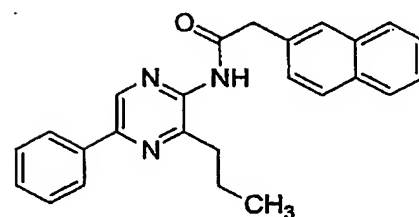
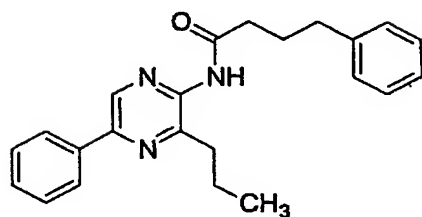
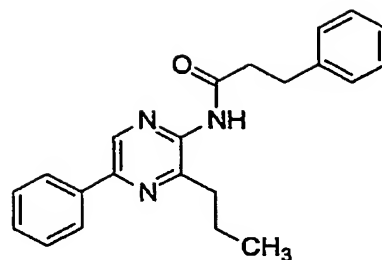
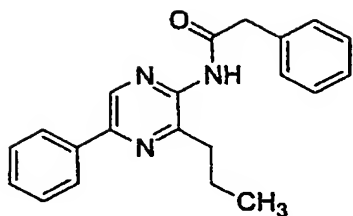
【0136】

【化 37】



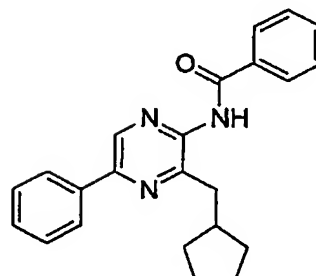
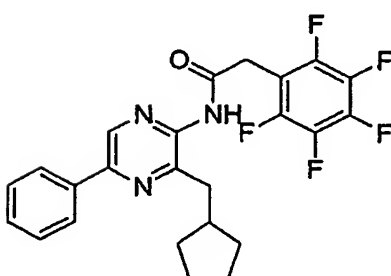
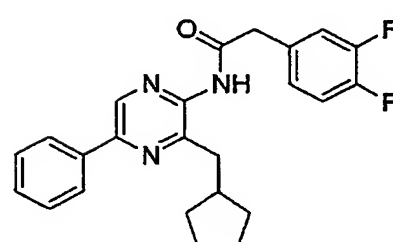
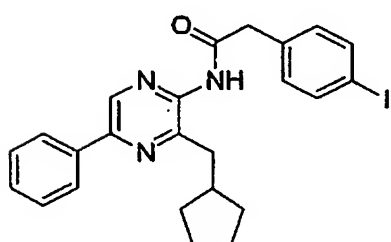
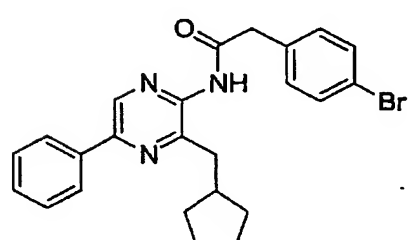
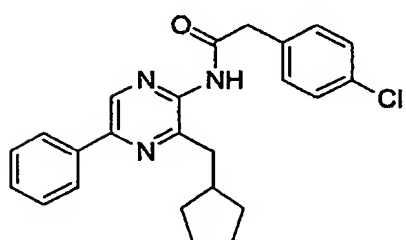
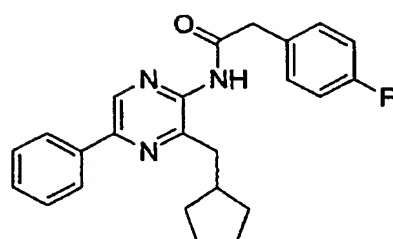
【0137】

【化 38】



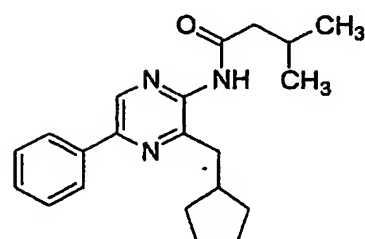
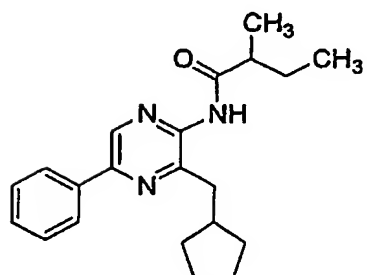
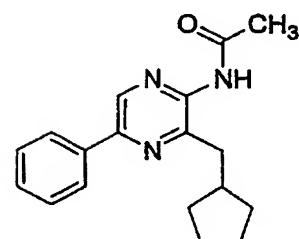
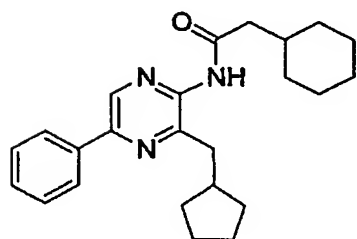
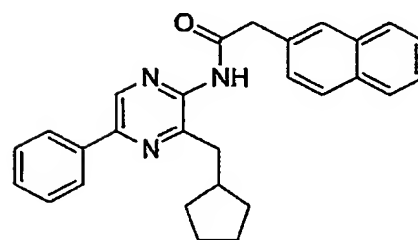
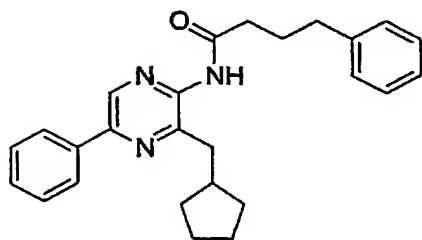
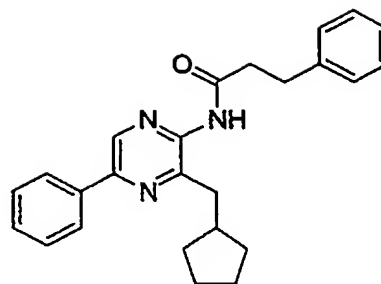
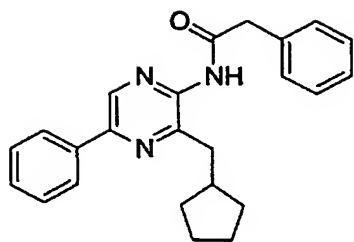
【0138】

【化 39】



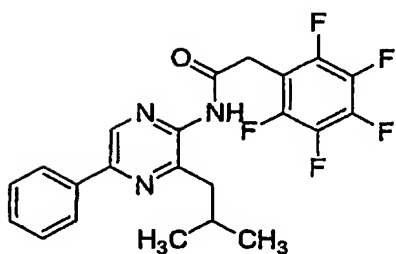
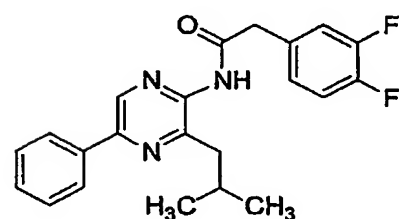
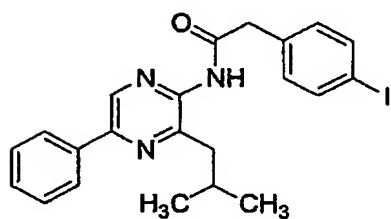
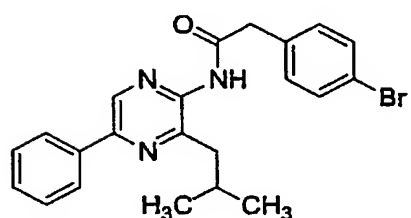
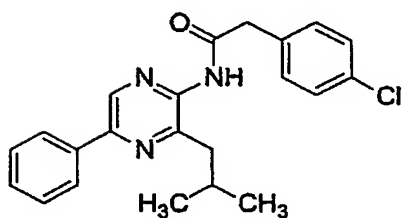
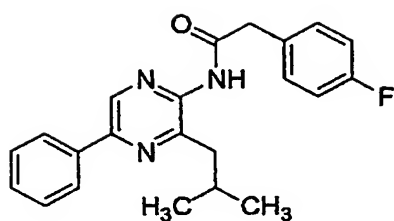
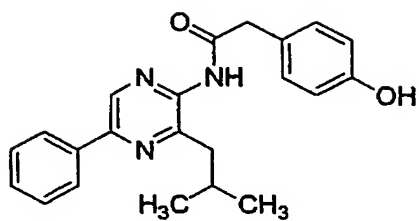
【0139】

【化 40】

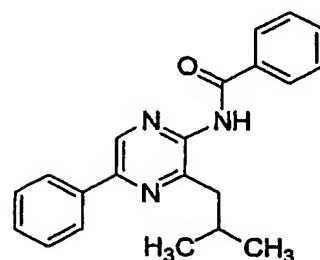


【0140】

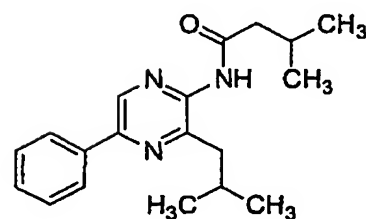
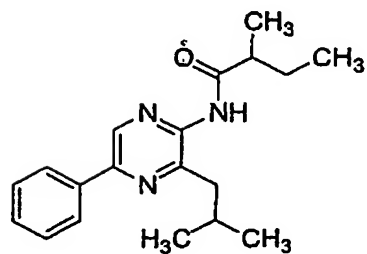
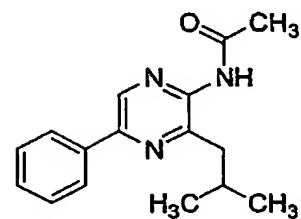
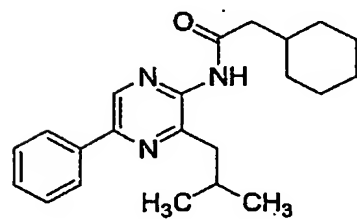
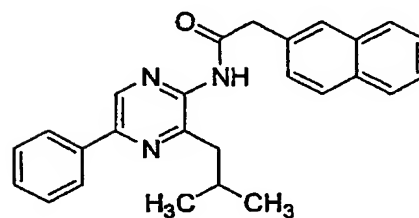
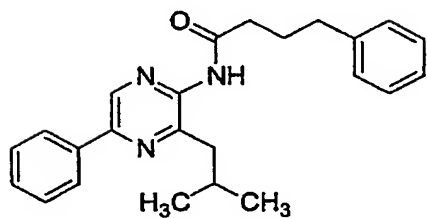
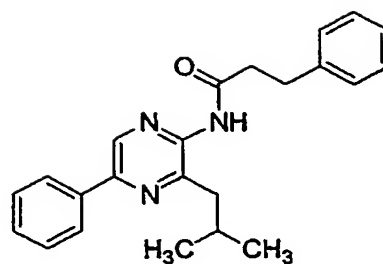
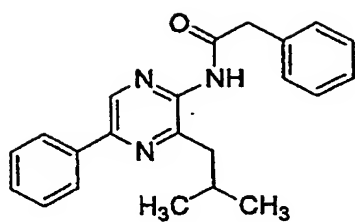
【化41】



【0141】

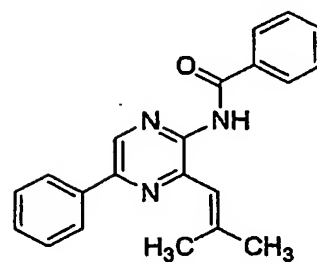
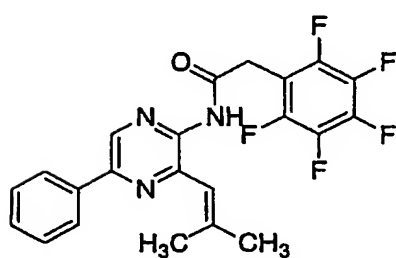
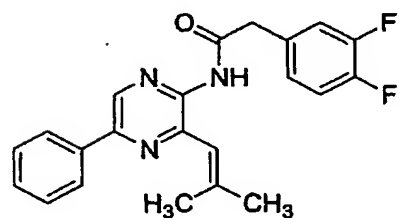
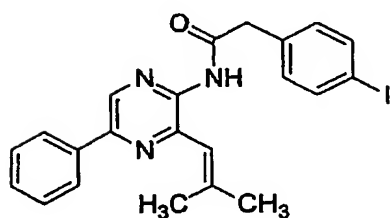
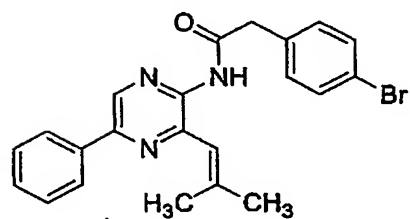
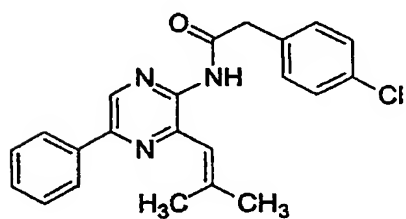
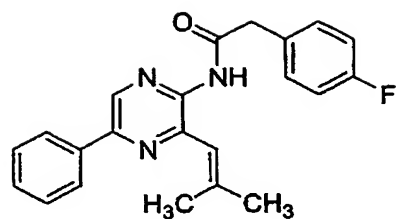
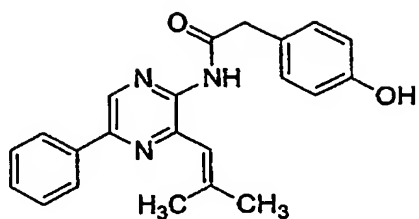


【化 4 2】



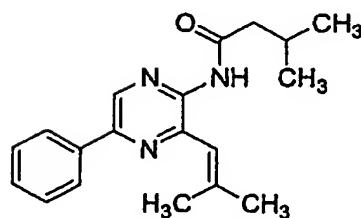
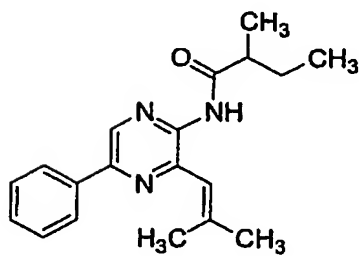
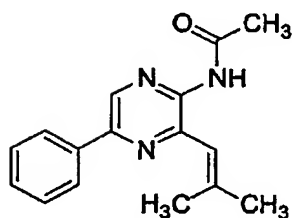
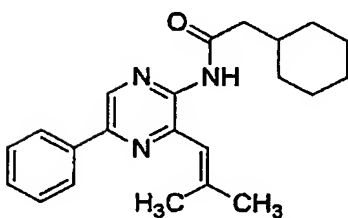
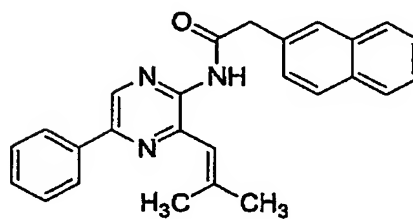
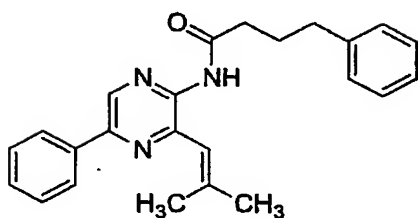
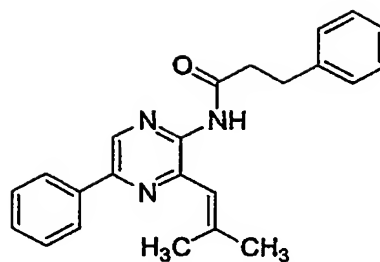
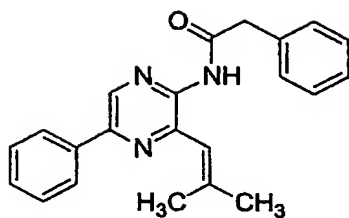
【0142】

【化 4 3】



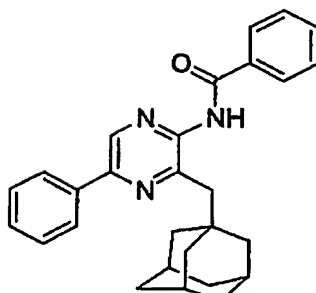
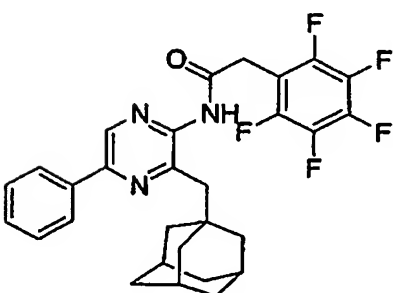
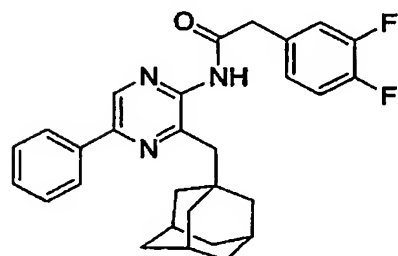
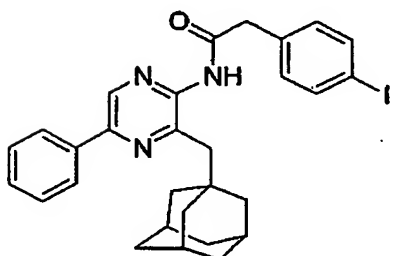
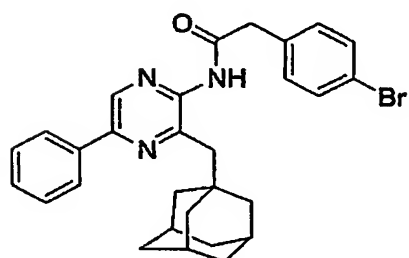
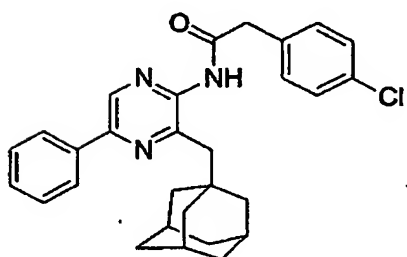
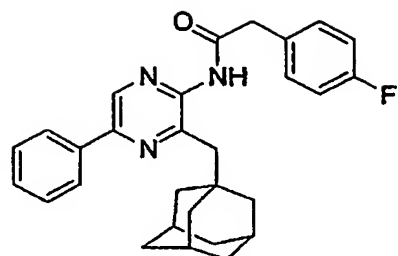
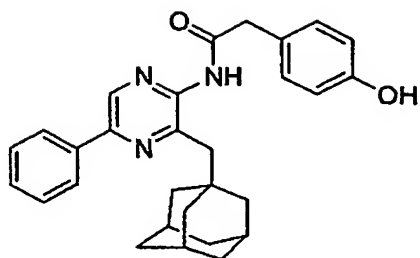
【0 1 4 3】

【化 4 4】



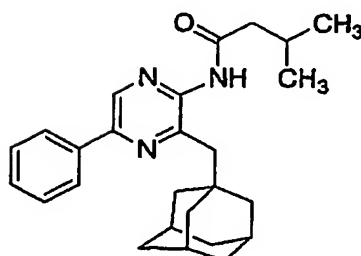
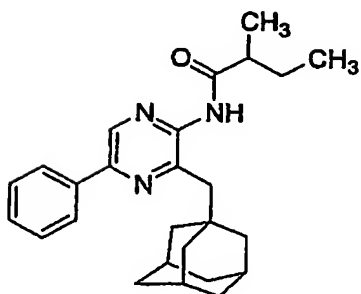
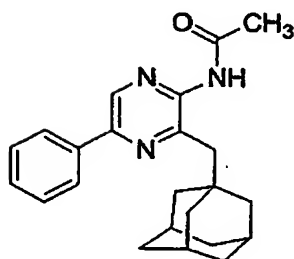
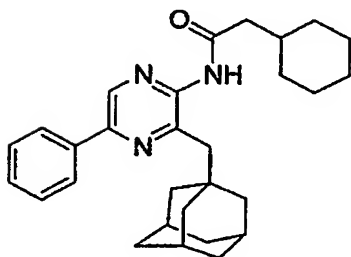
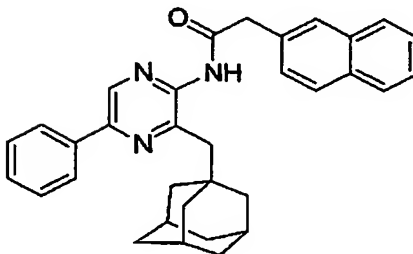
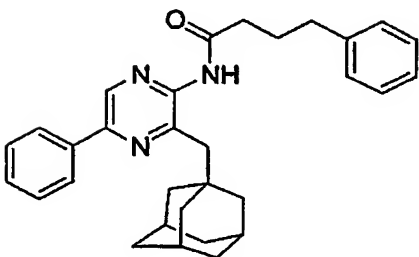
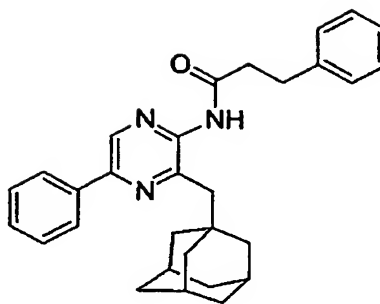
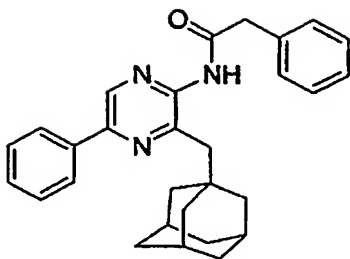
【0144】

【化 45】



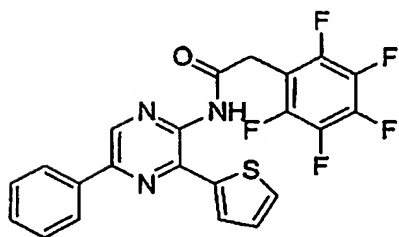
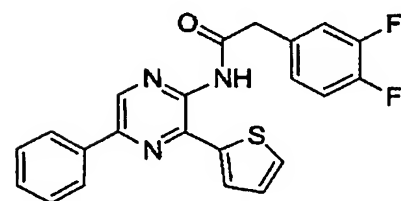
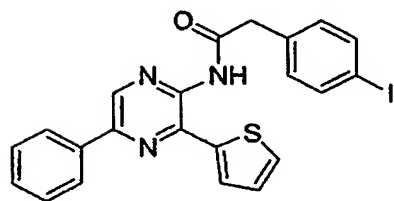
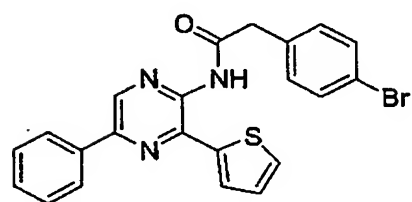
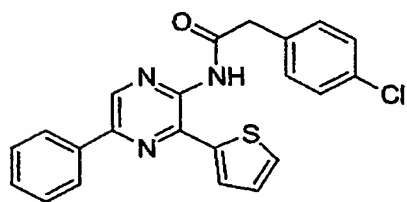
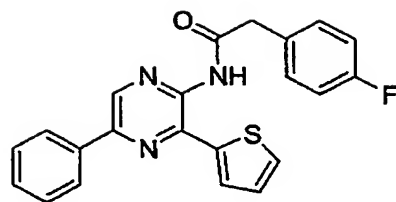
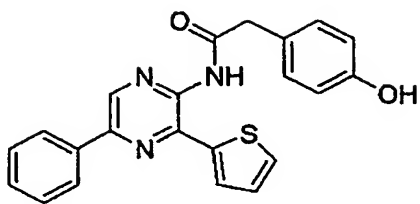
【0145】

【化46】

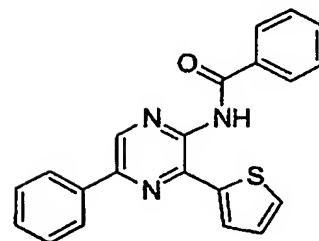


【0146】

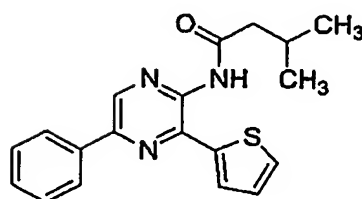
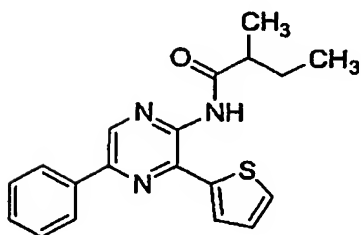
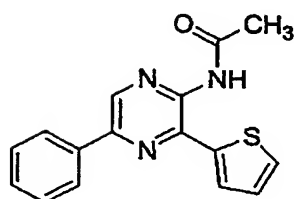
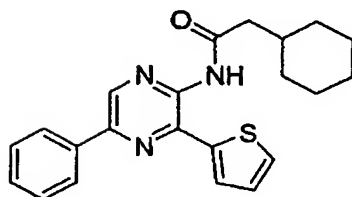
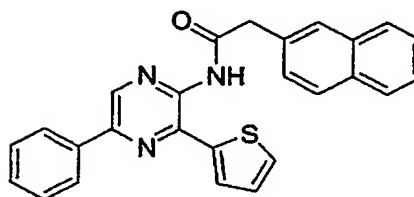
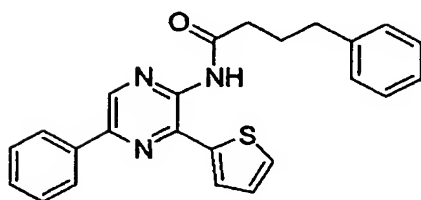
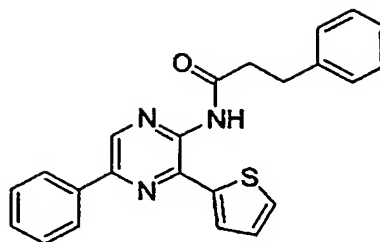
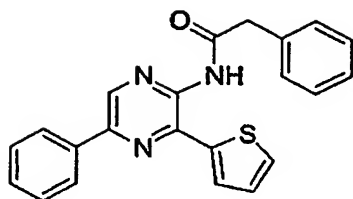
【化47】



【0147】

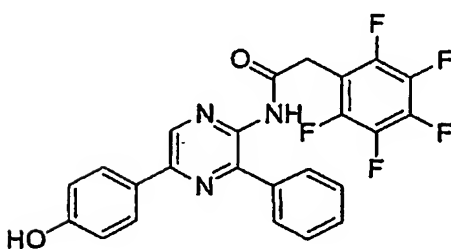
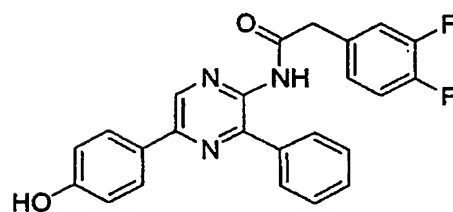
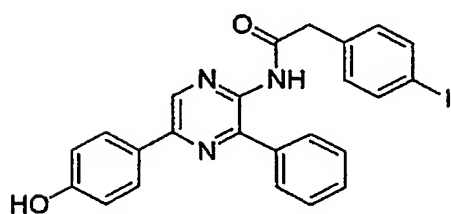
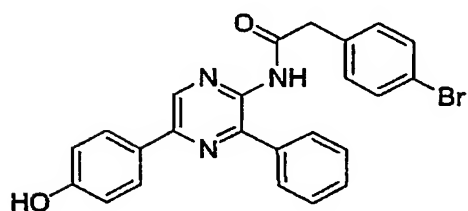
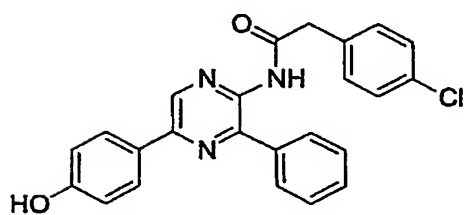
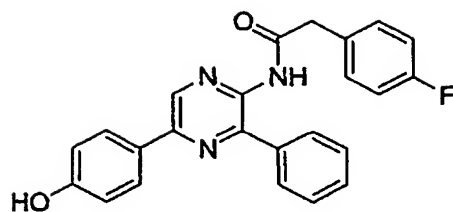
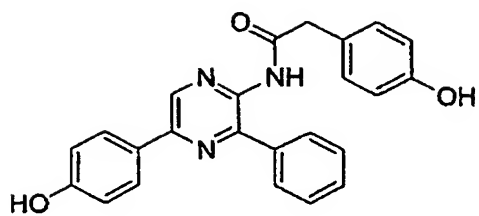


【化 48】

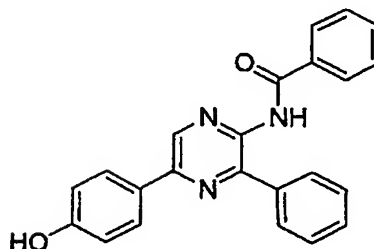


【0148】

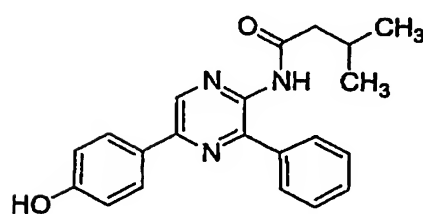
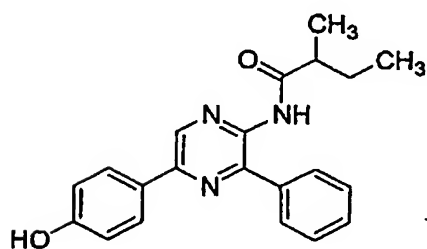
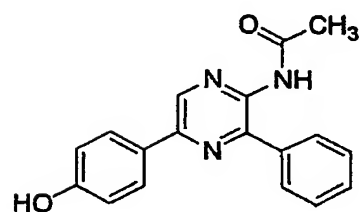
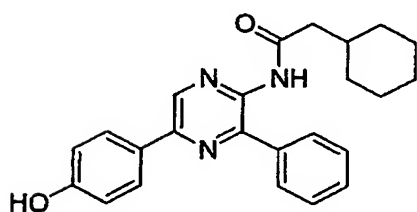
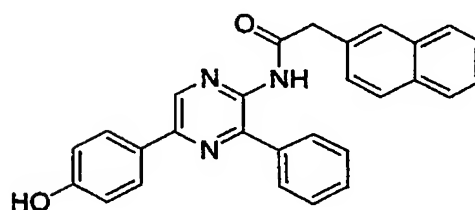
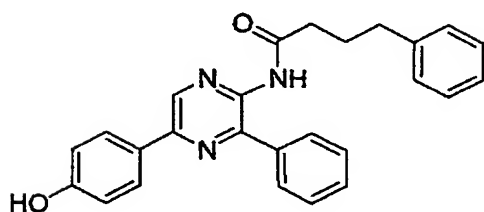
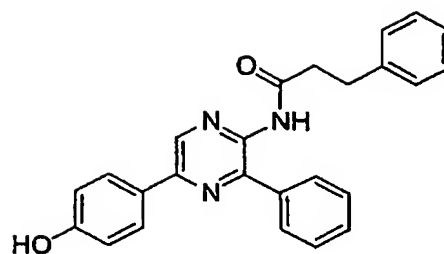
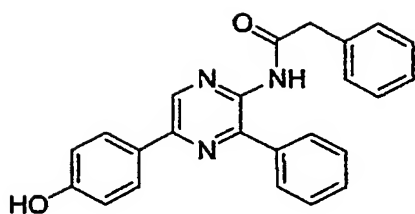
【化 49】



【0149】

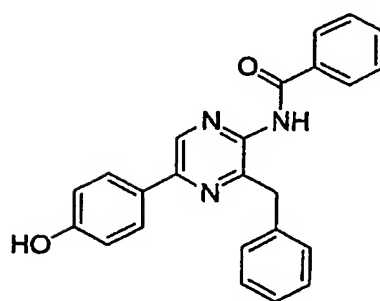
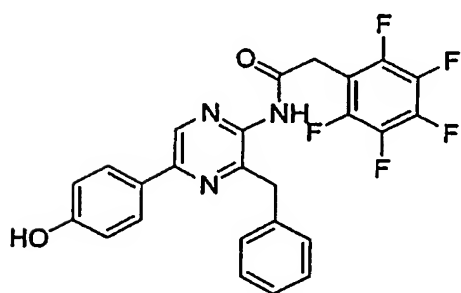
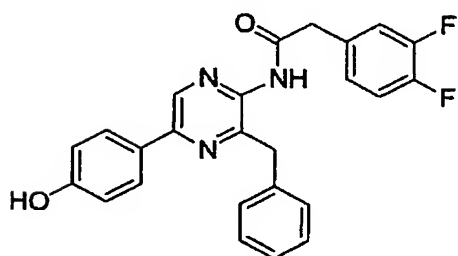
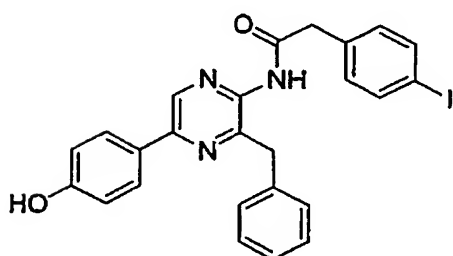
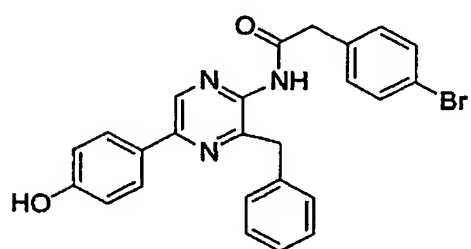
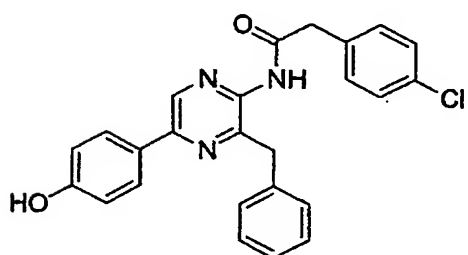
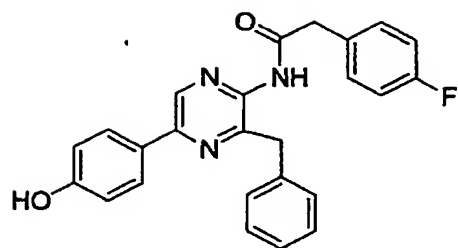
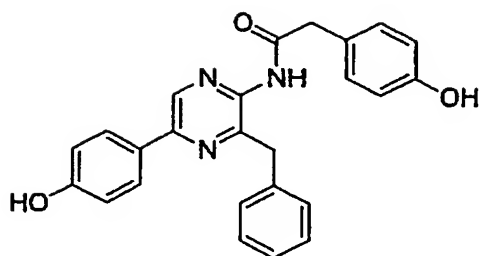


【化50】



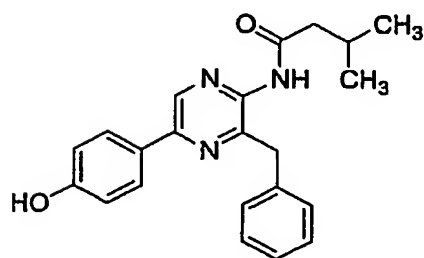
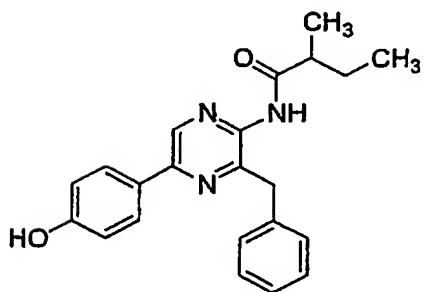
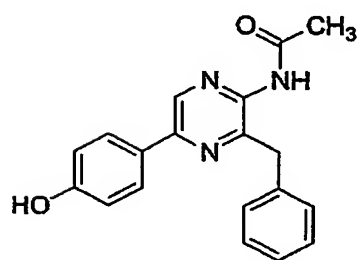
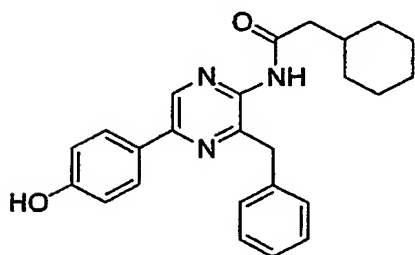
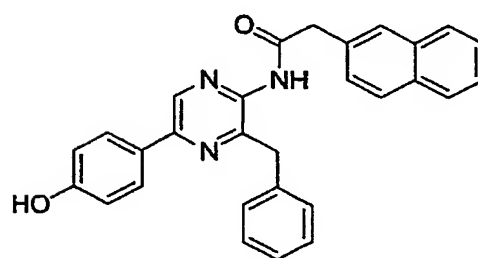
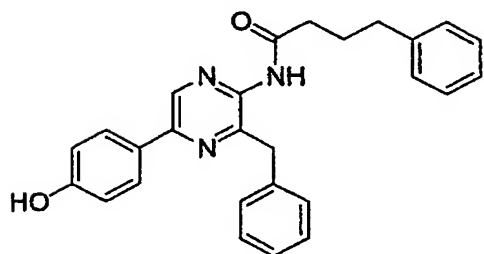
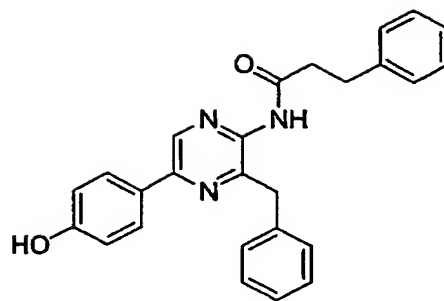
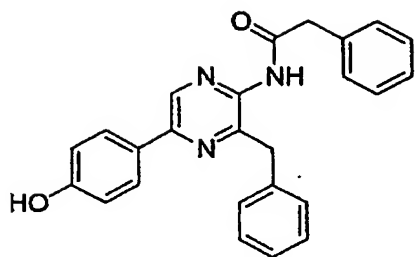
【0150】

【化 5 1】



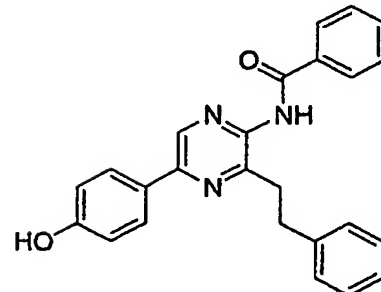
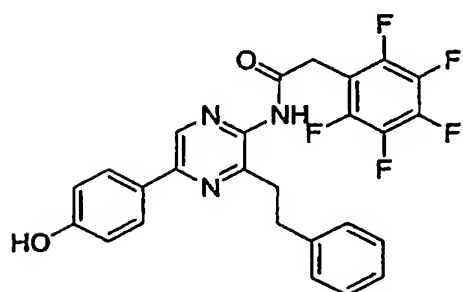
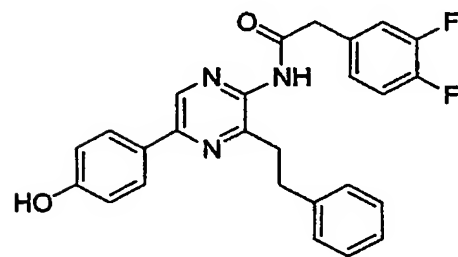
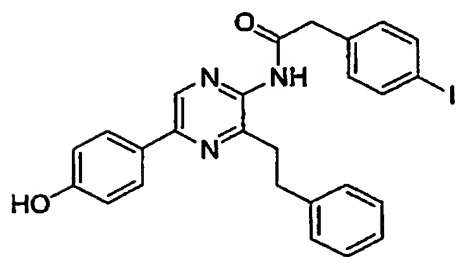
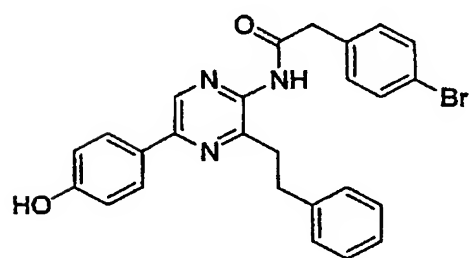
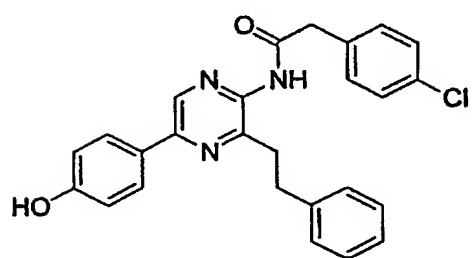
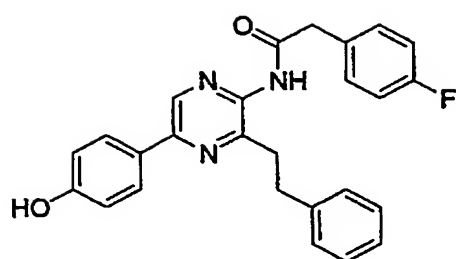
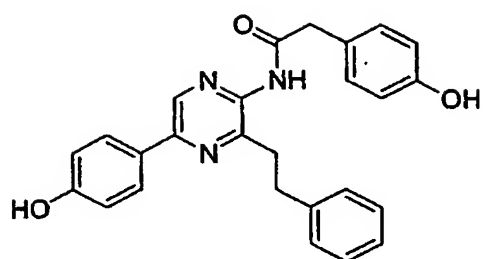
【0151】

【化 5 2】



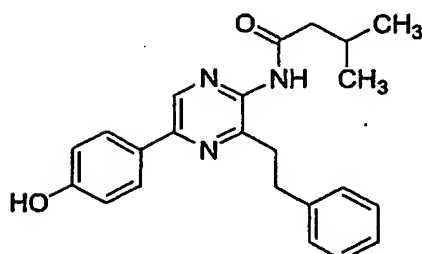
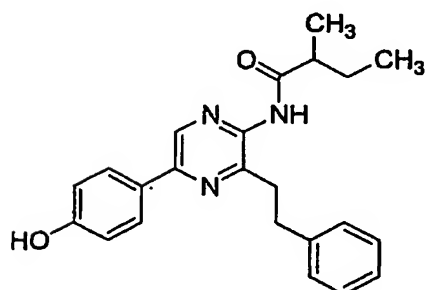
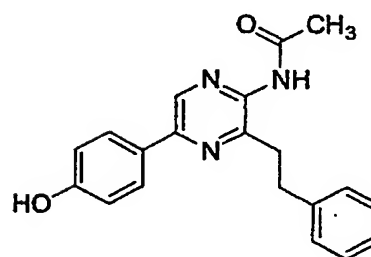
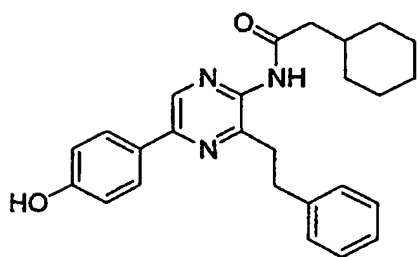
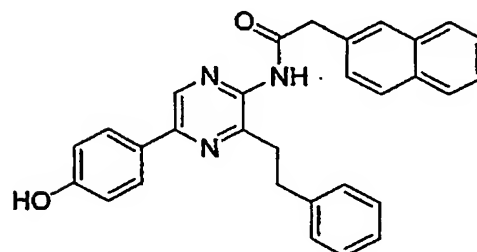
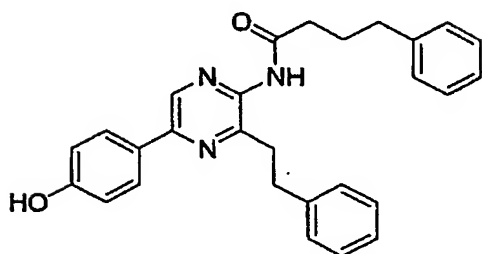
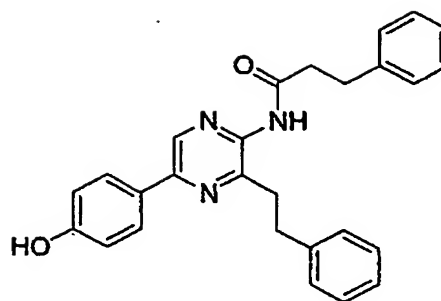
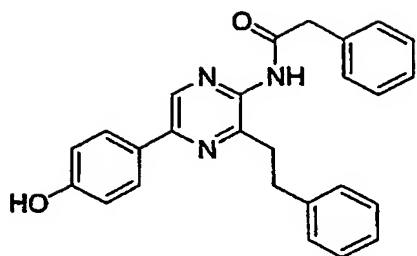
【0152】

【化53】



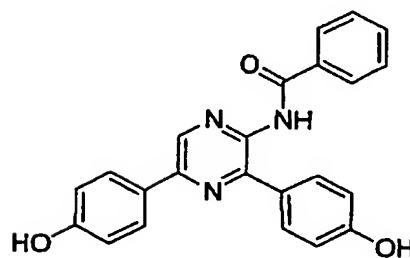
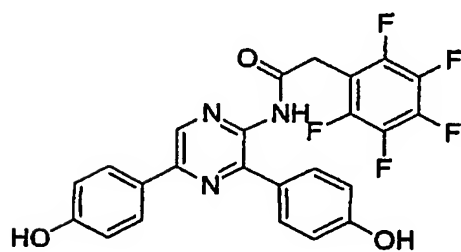
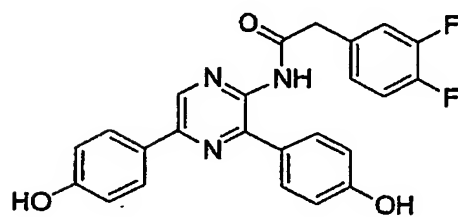
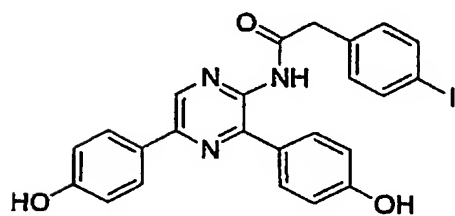
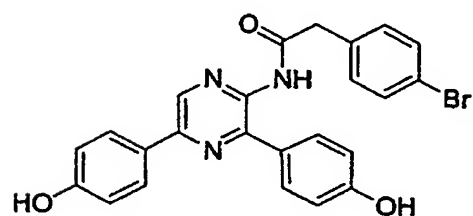
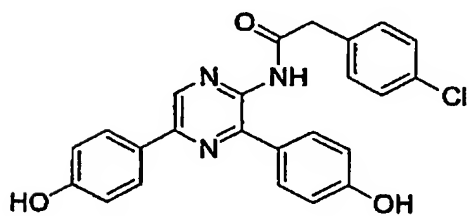
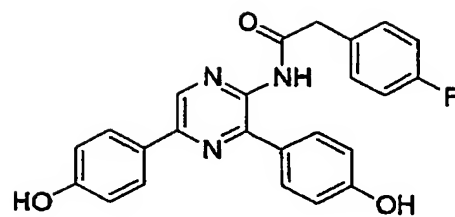
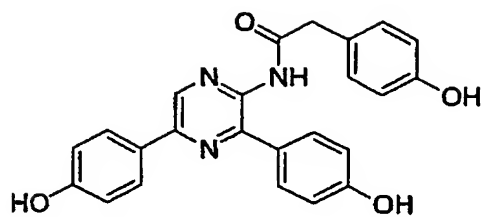
【0153】

【化54】



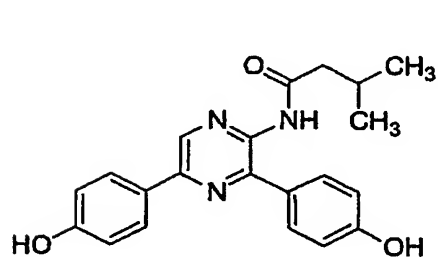
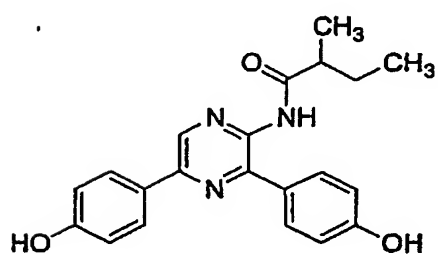
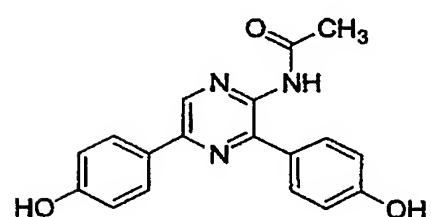
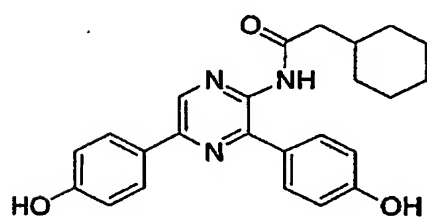
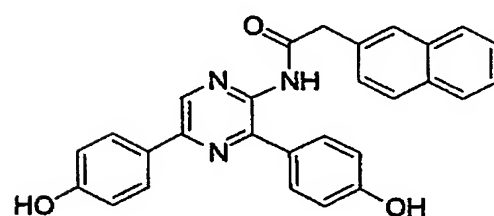
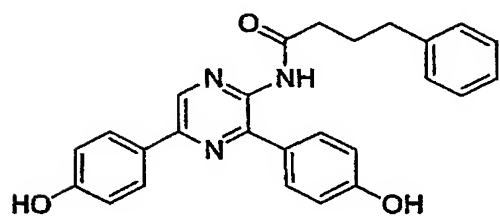
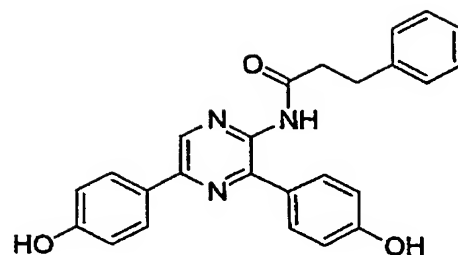
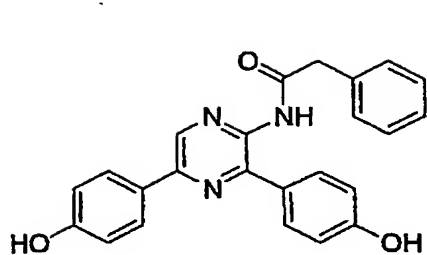
【0154】

【化55】



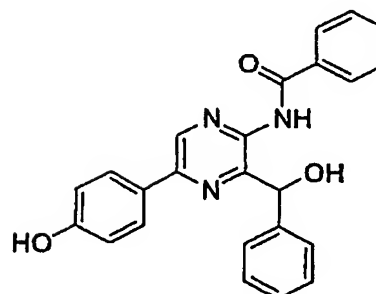
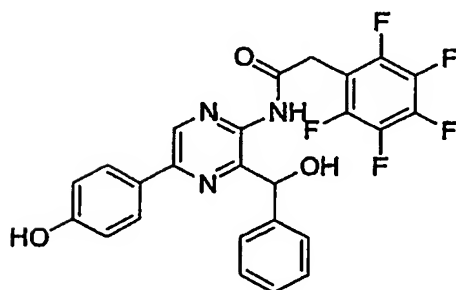
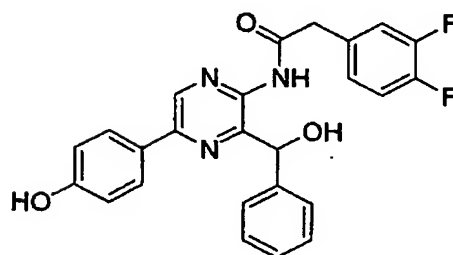
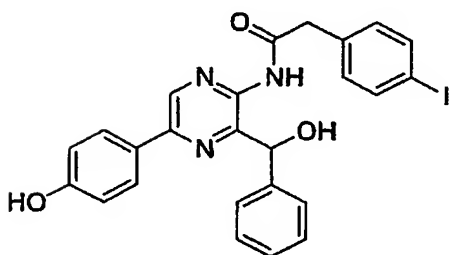
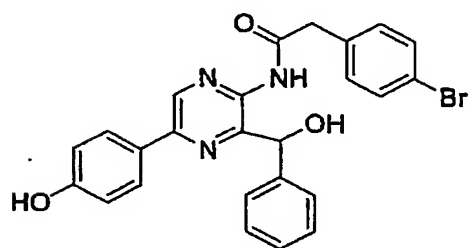
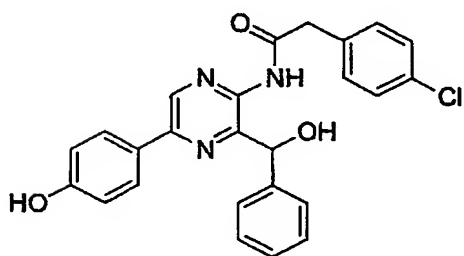
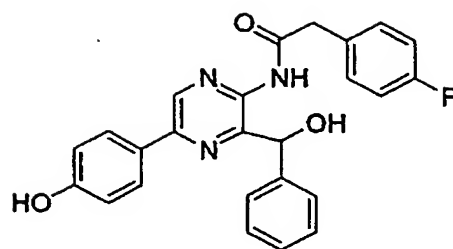
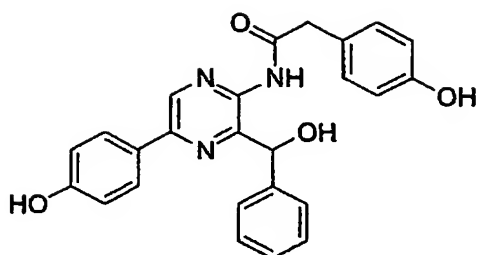
【0155】

【化56】



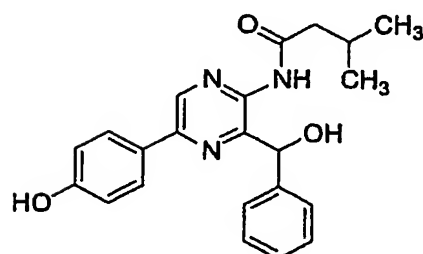
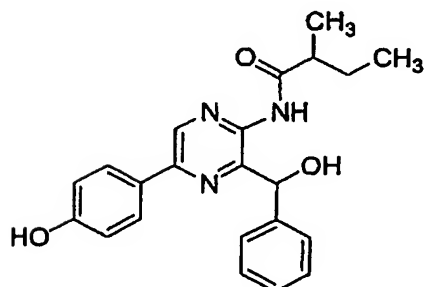
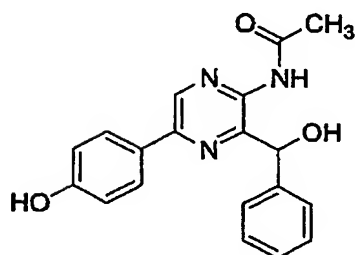
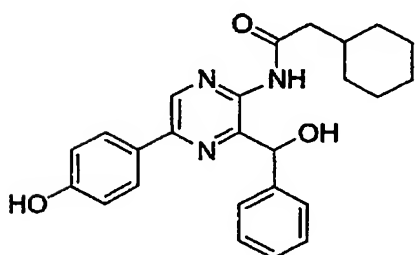
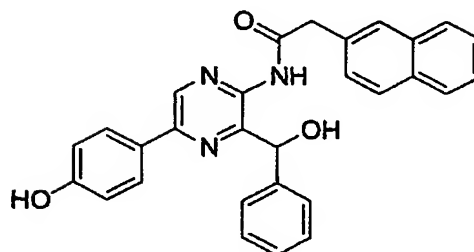
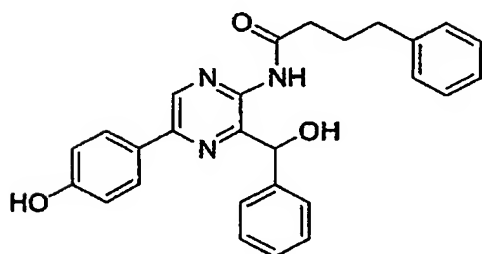
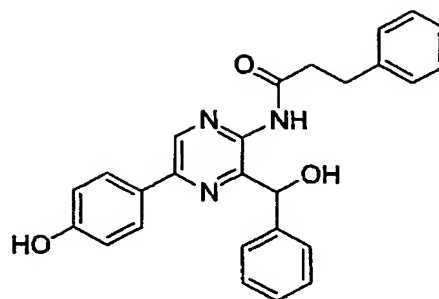
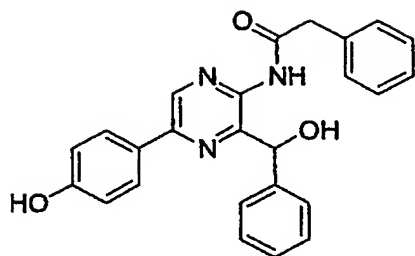
【0156】

【化57】



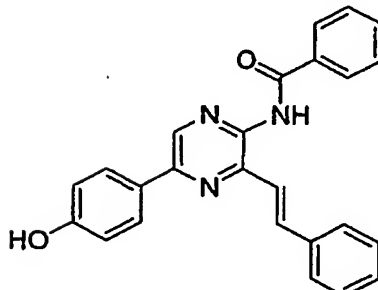
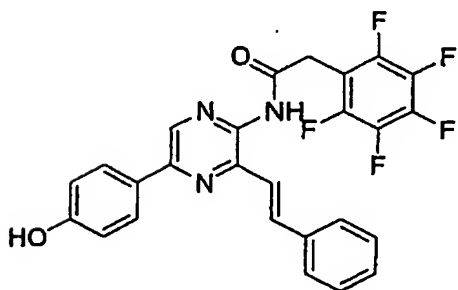
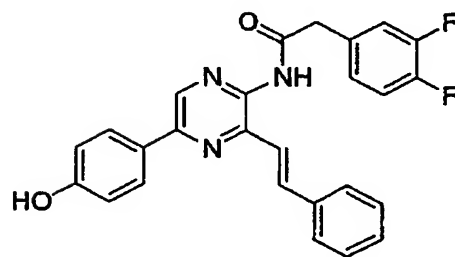
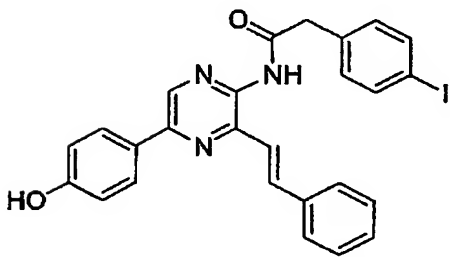
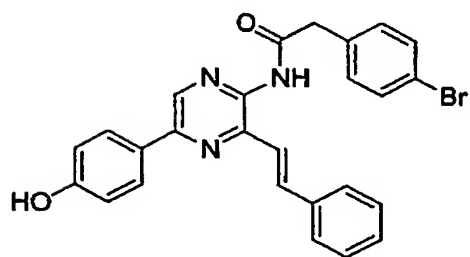
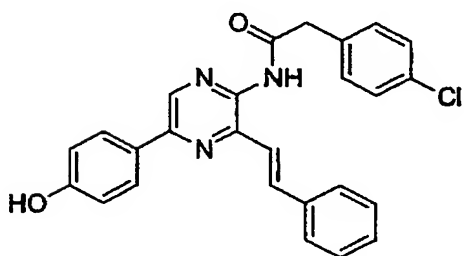
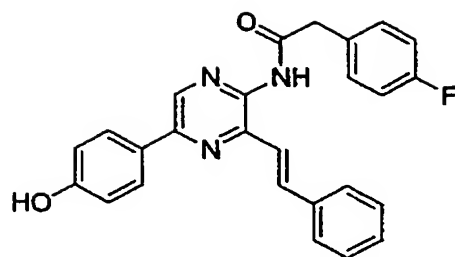
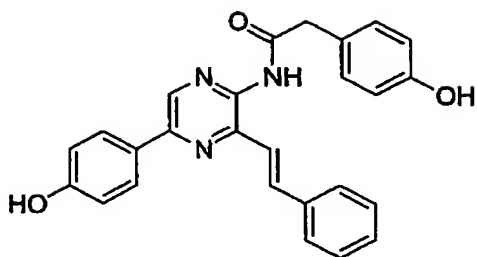
【0157】

【化58】



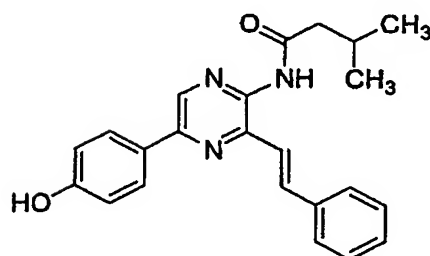
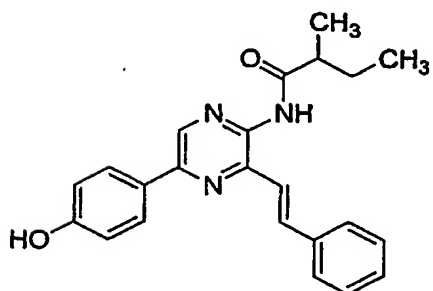
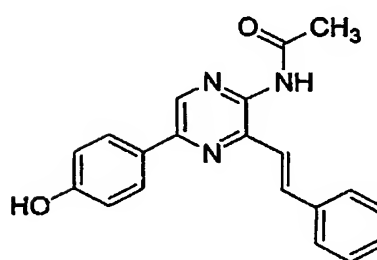
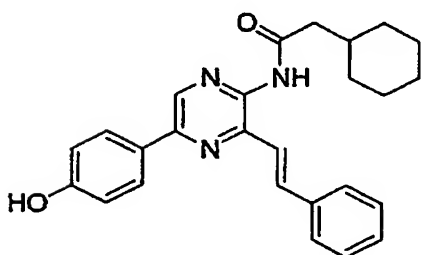
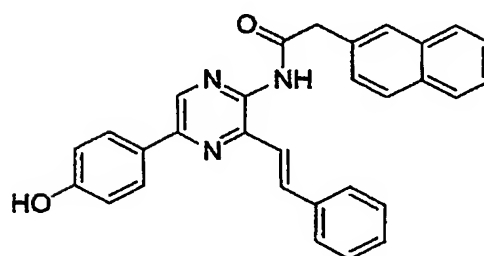
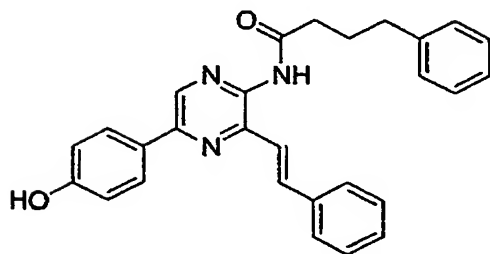
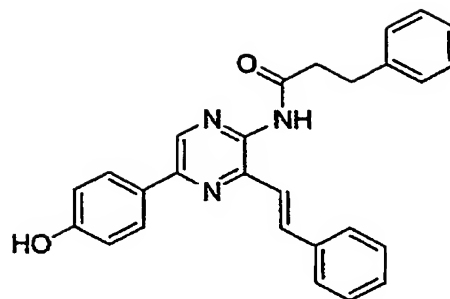
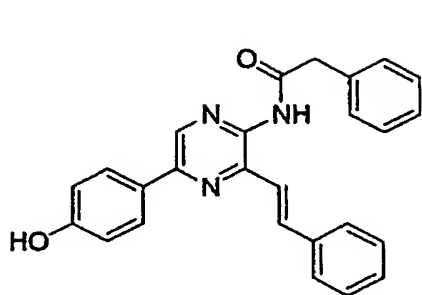
【0158】

【化59】



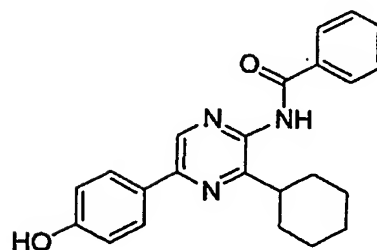
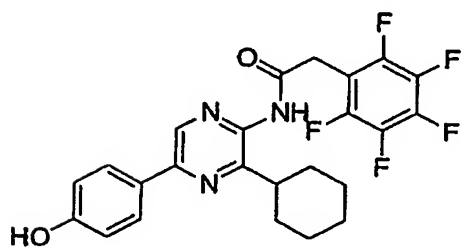
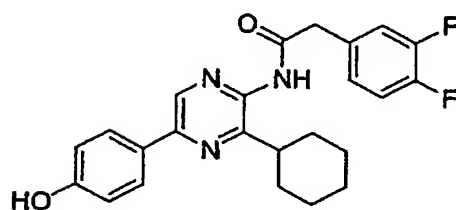
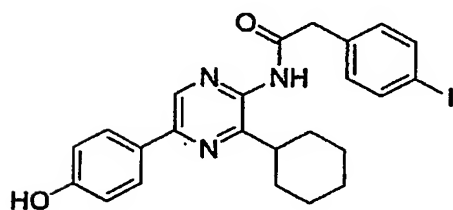
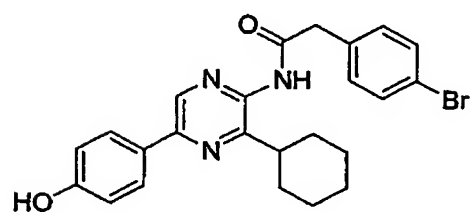
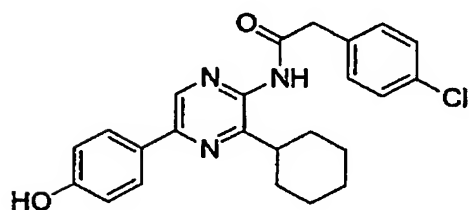
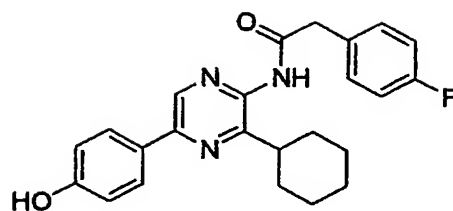
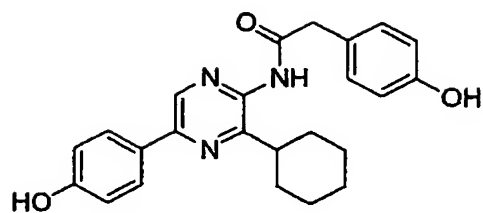
【0159】

【化60】



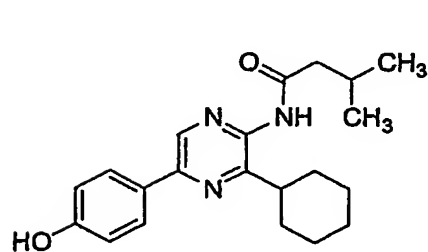
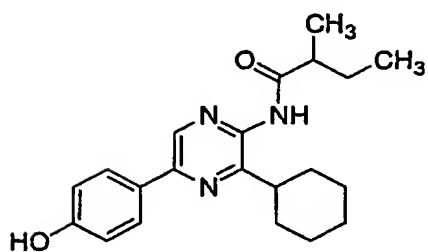
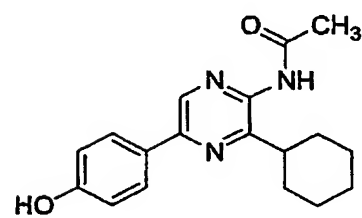
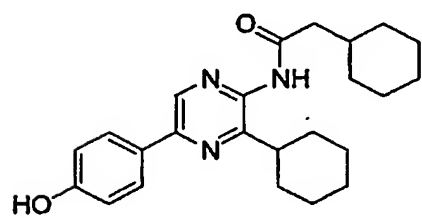
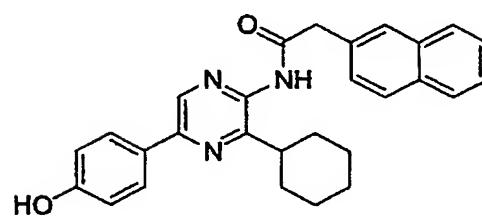
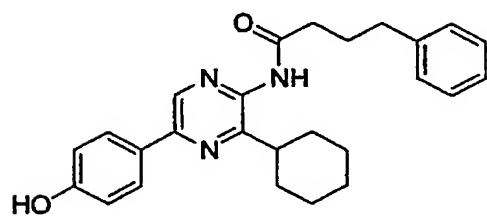
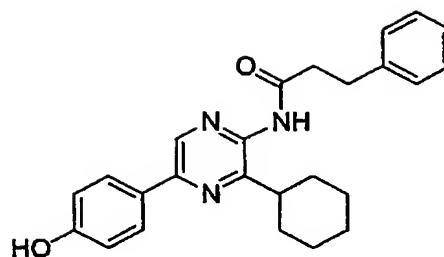
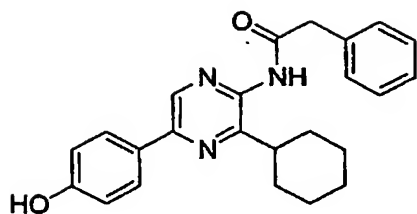
【0160】

【化61】



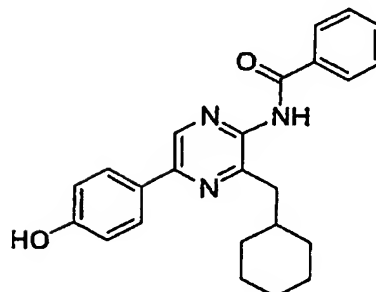
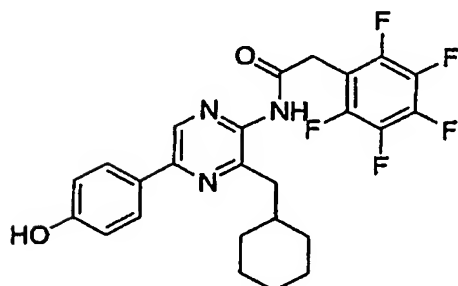
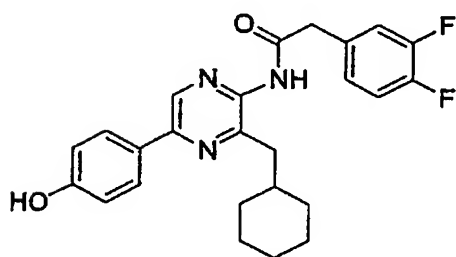
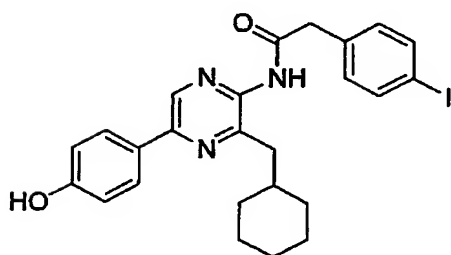
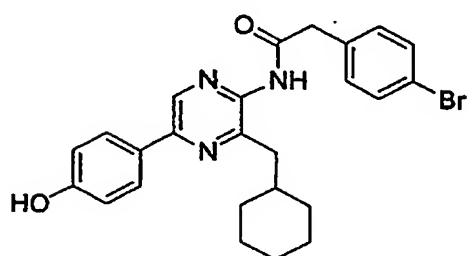
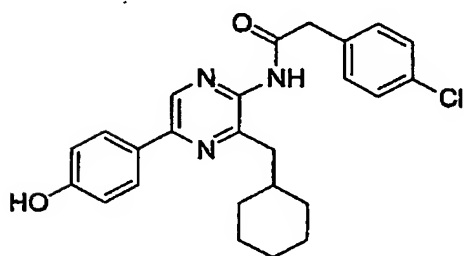
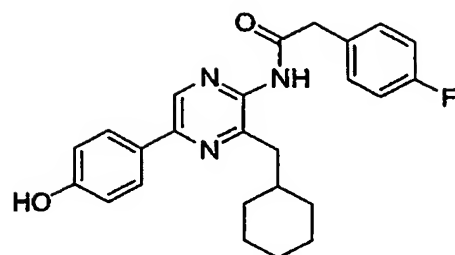
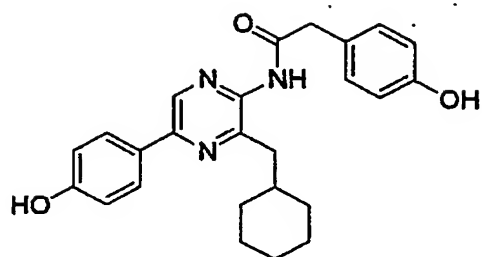
【0161】

【化62】



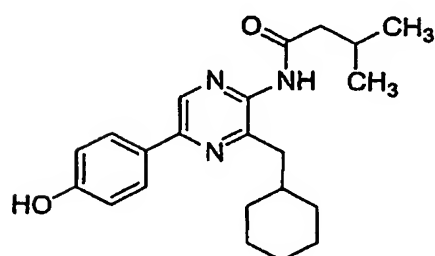
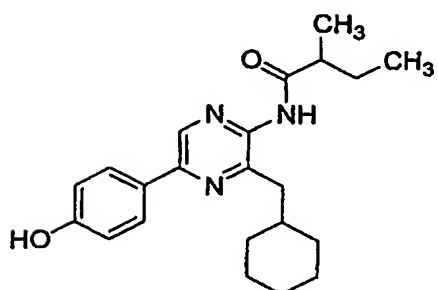
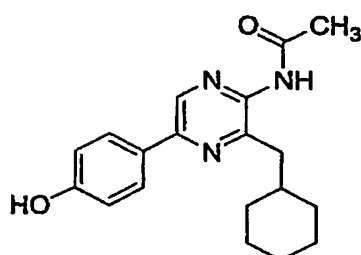
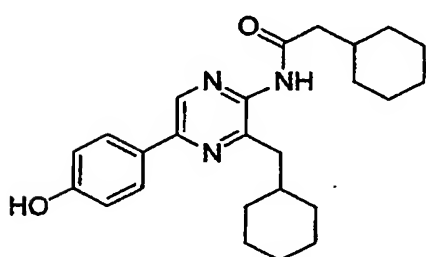
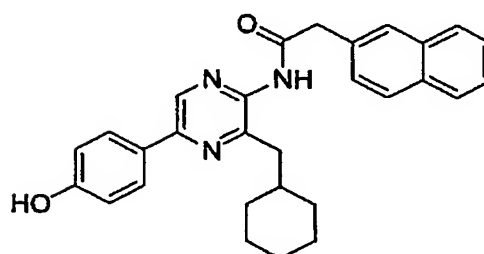
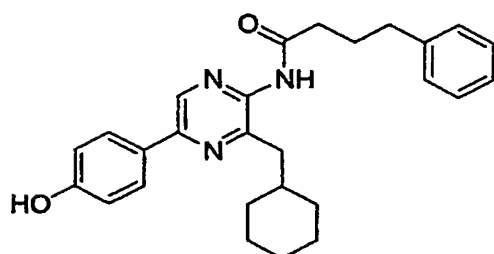
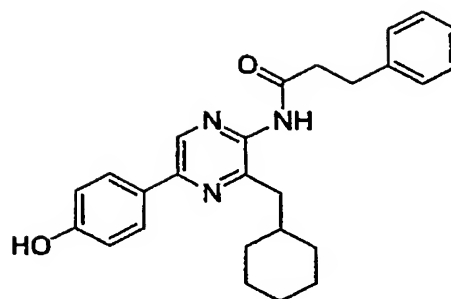
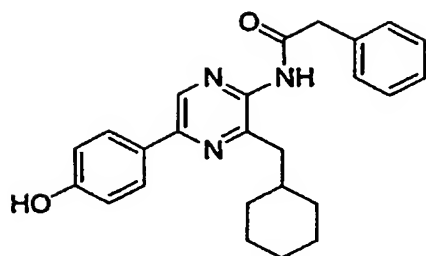
【0162】

【化63】



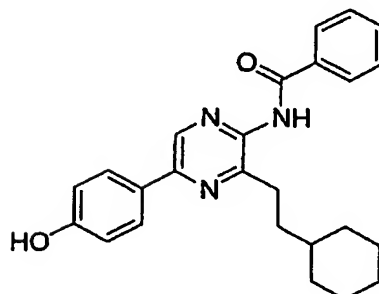
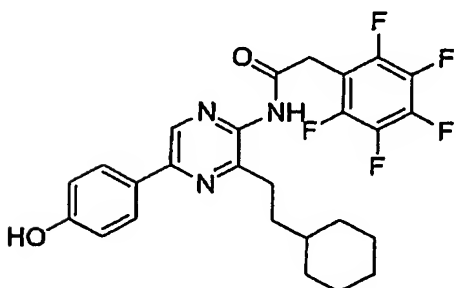
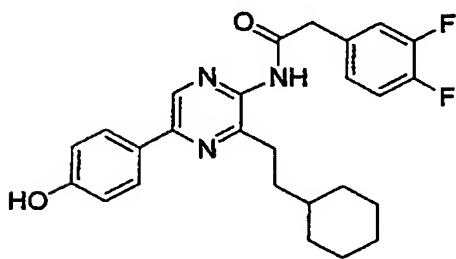
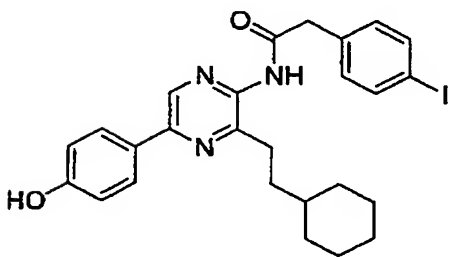
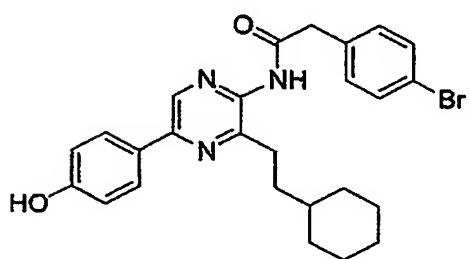
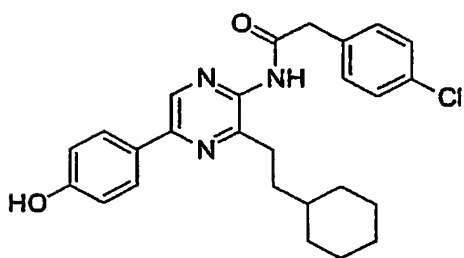
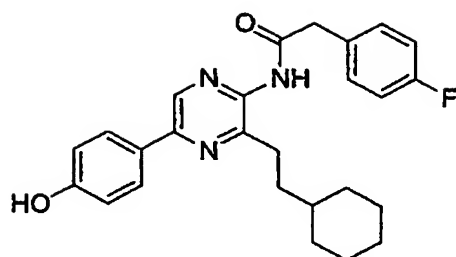
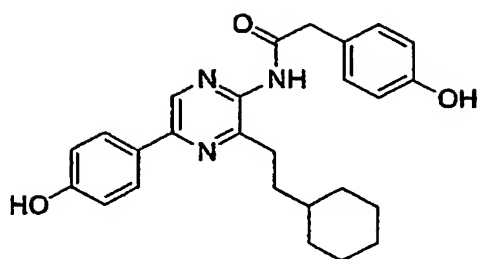
【0163】

【化64】



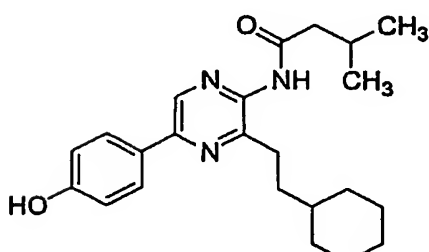
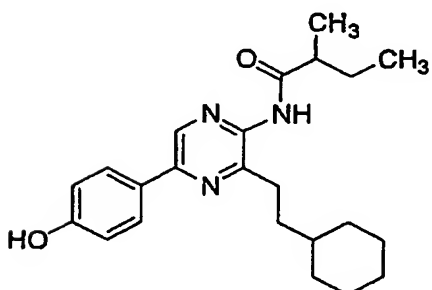
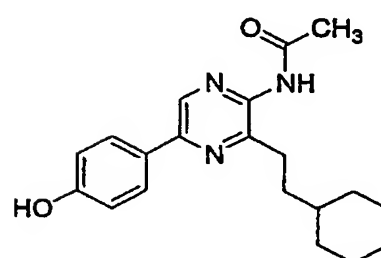
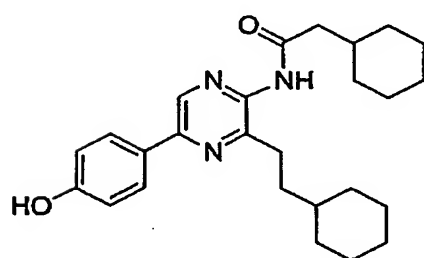
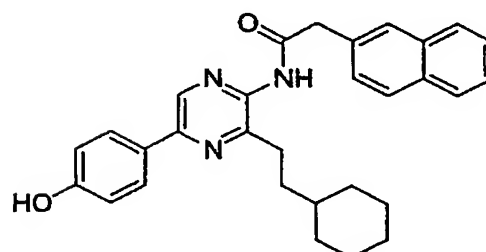
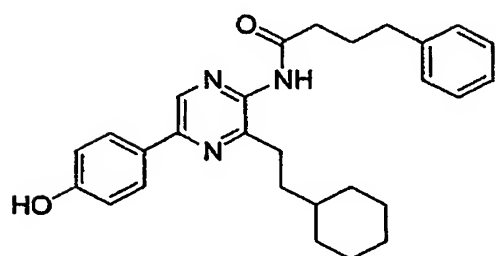
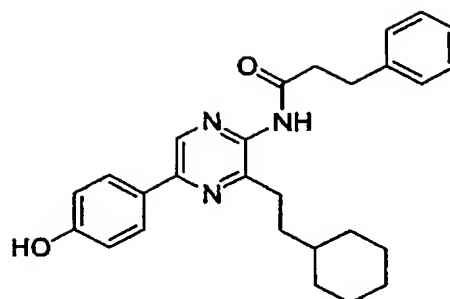
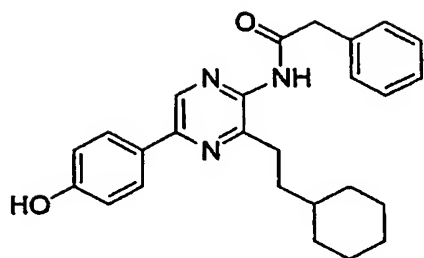
【0164】

【化65】



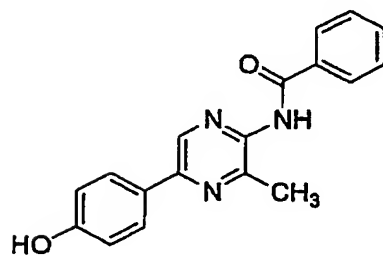
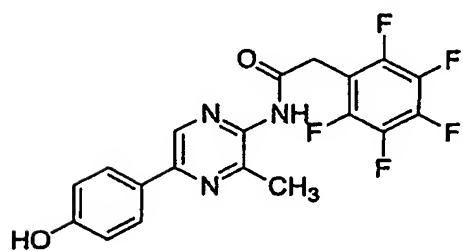
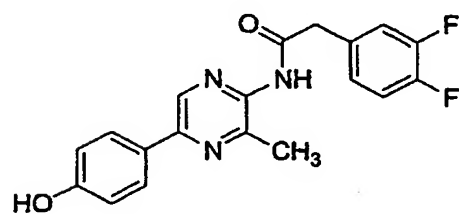
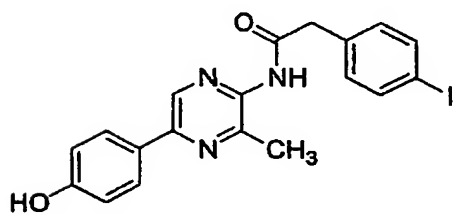
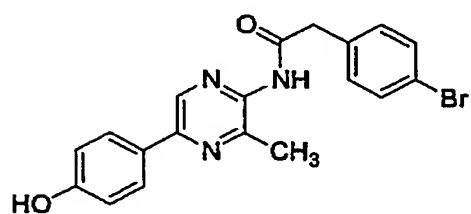
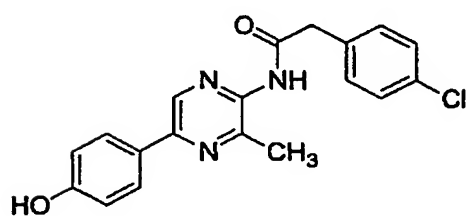
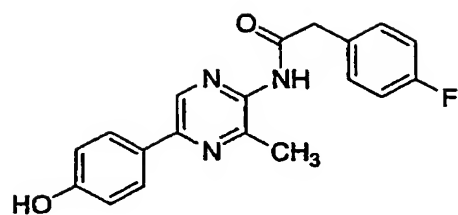
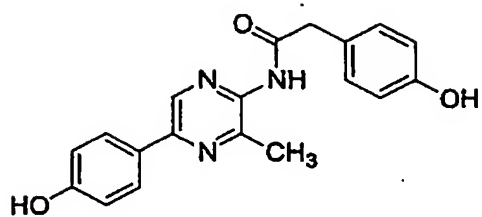
【0165】

【化66】



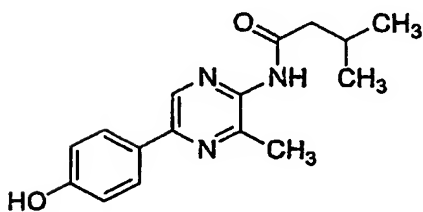
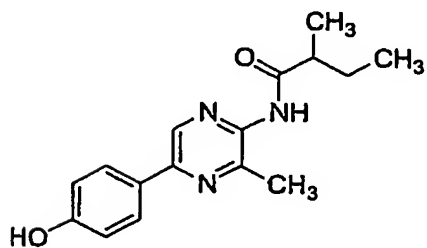
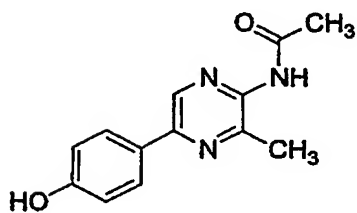
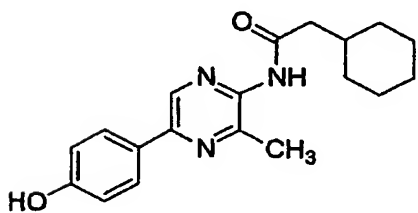
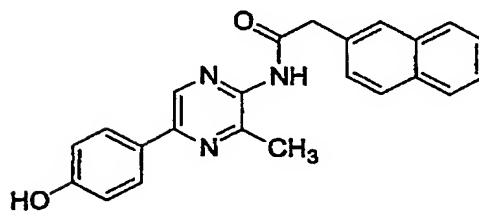
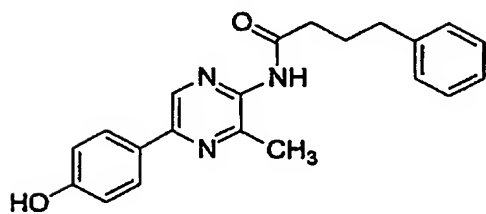
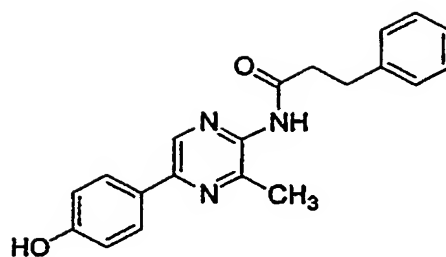
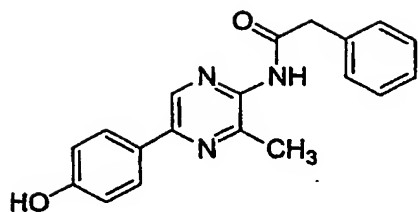
【0166】

【化67】



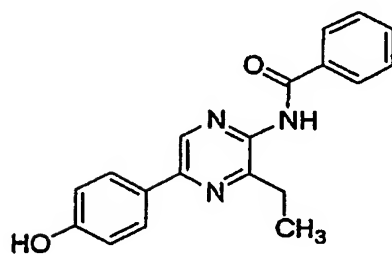
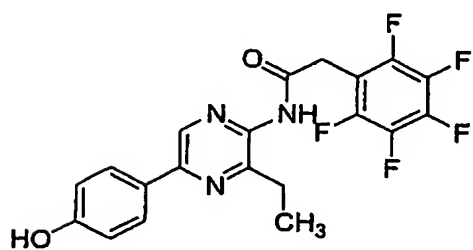
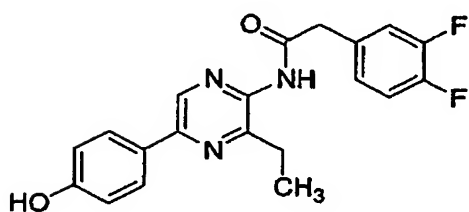
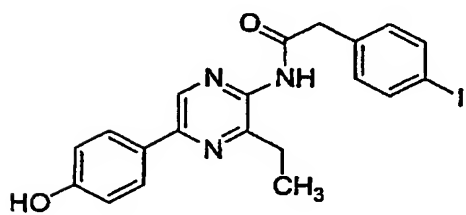
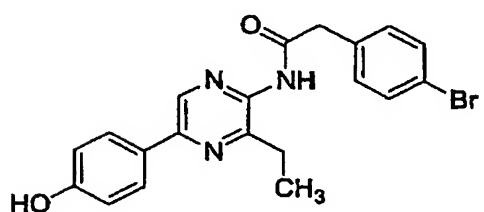
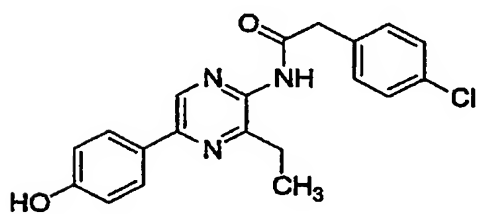
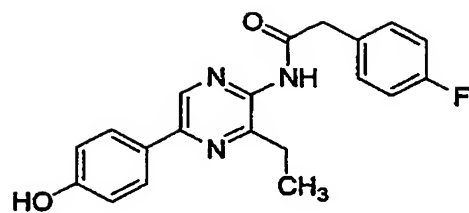
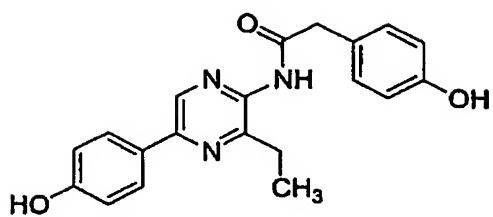
【0167】

【化68】



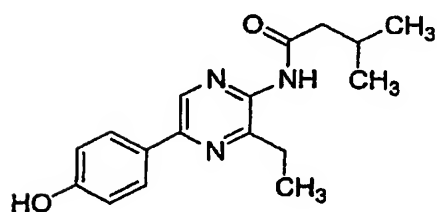
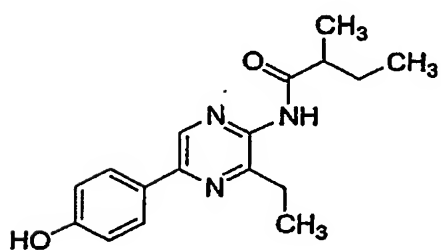
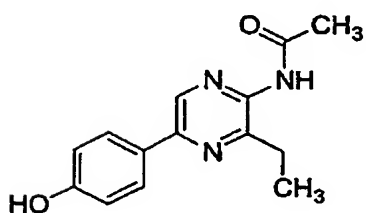
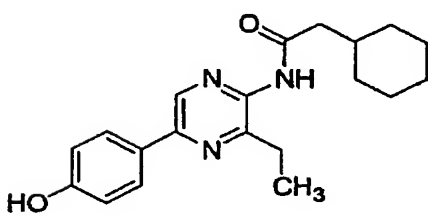
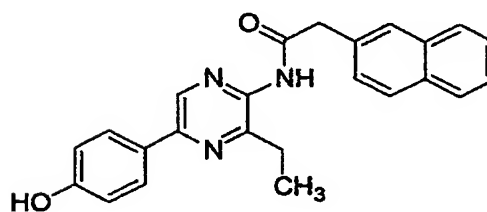
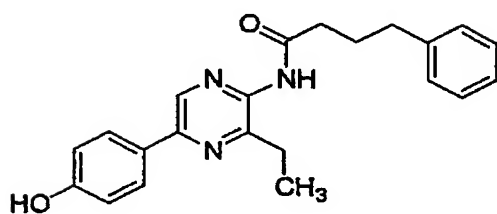
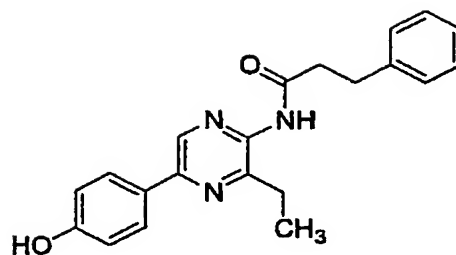
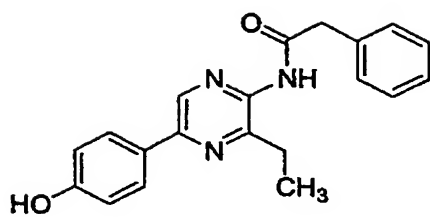
【0168】

【化69】



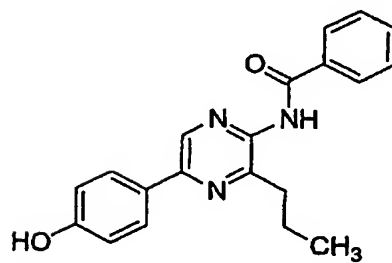
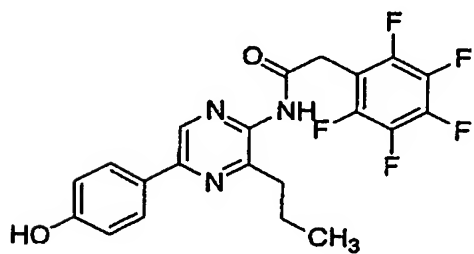
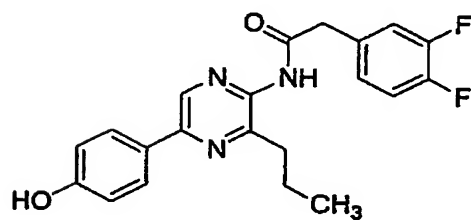
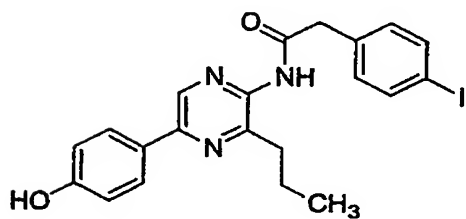
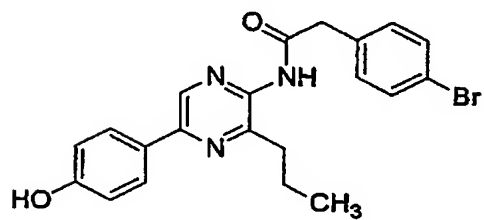
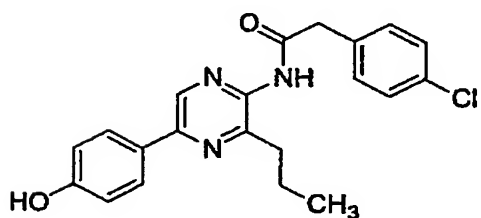
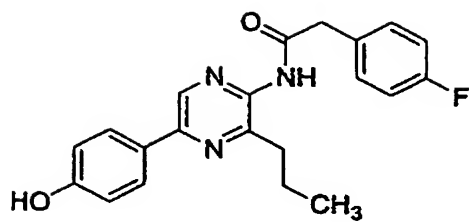
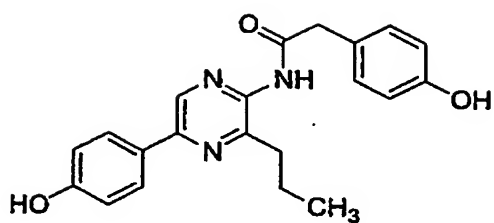
【0169】

【化70】



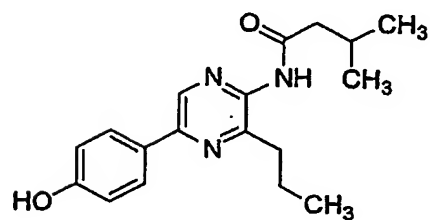
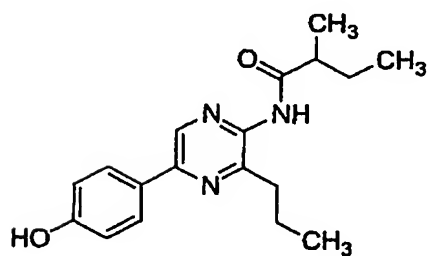
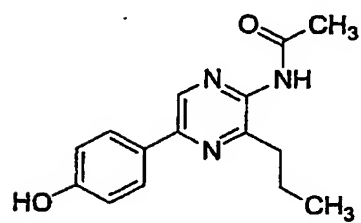
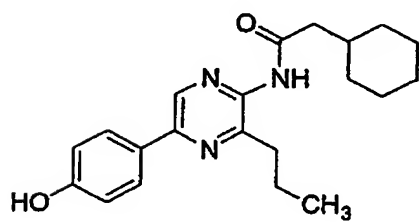
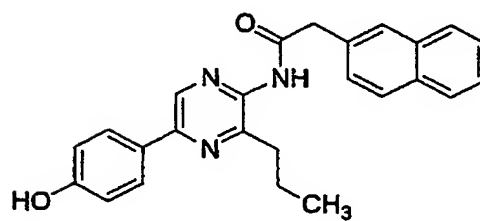
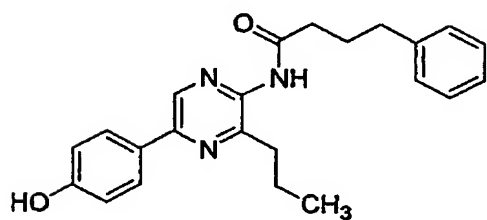
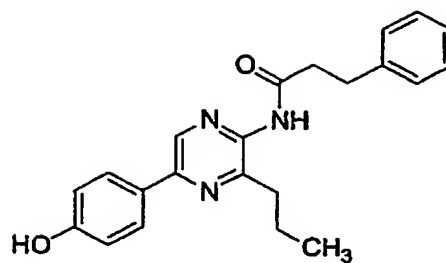
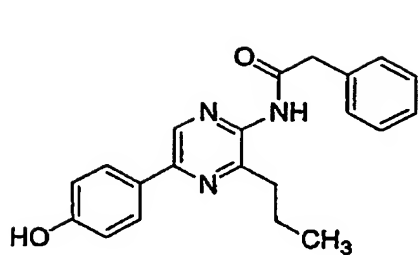
【0170】

【化71】



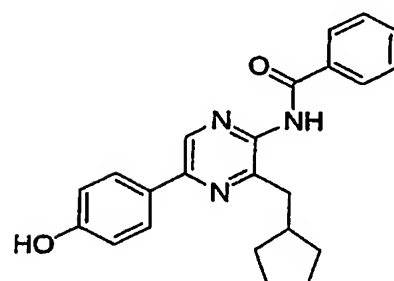
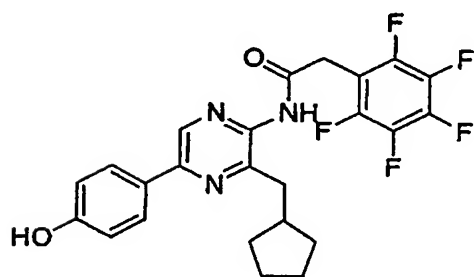
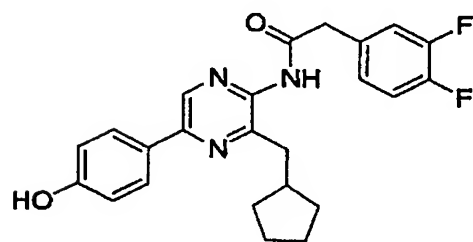
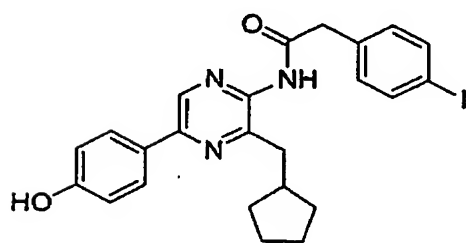
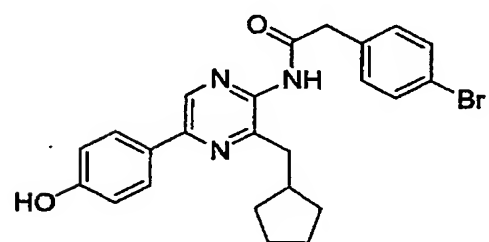
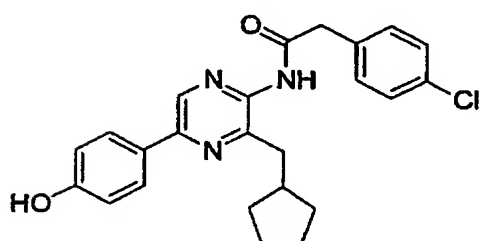
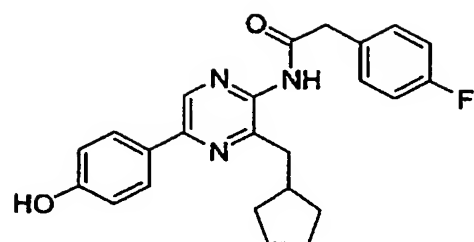
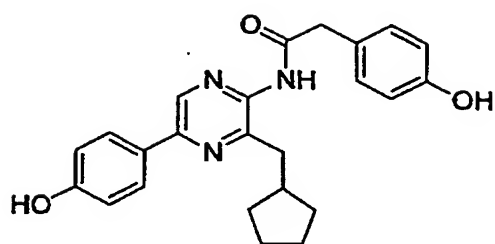
【0171】

【化72】



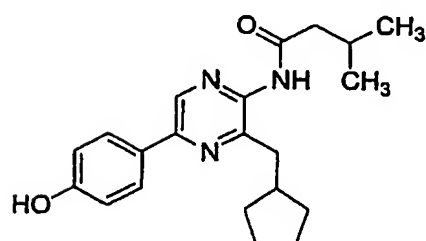
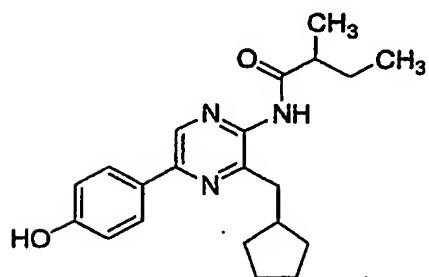
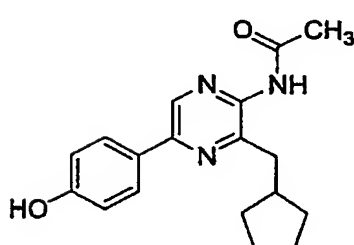
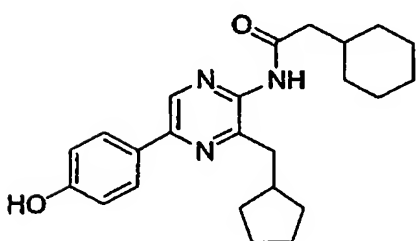
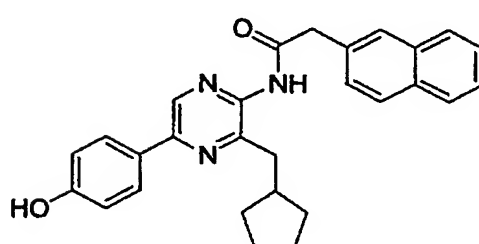
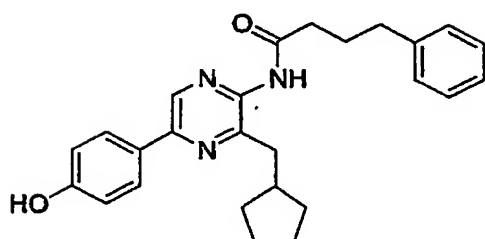
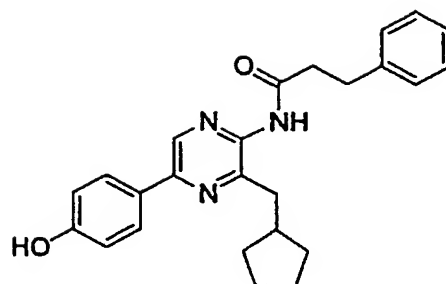
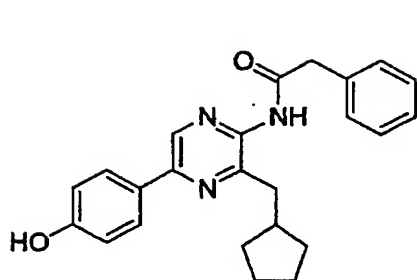
【0172】

【化73】



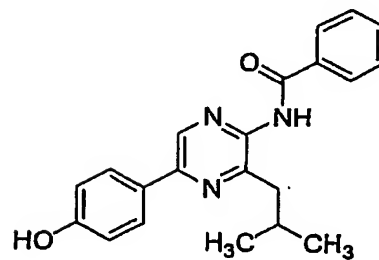
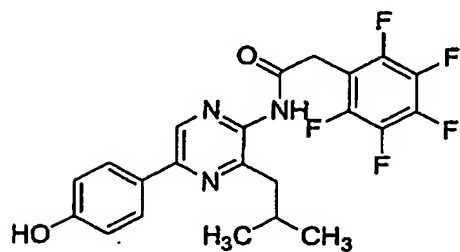
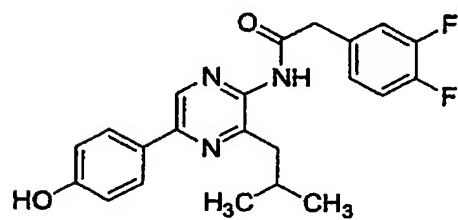
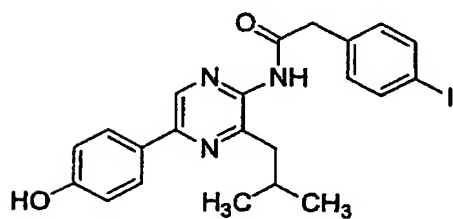
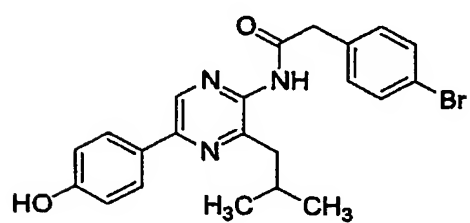
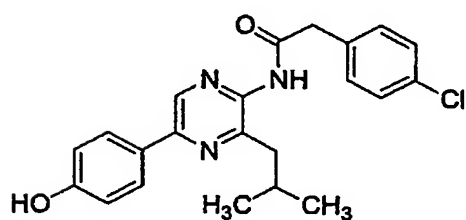
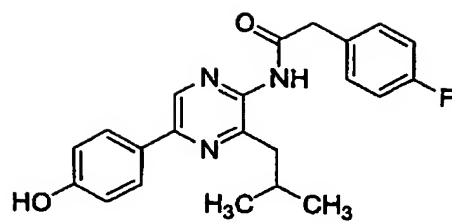
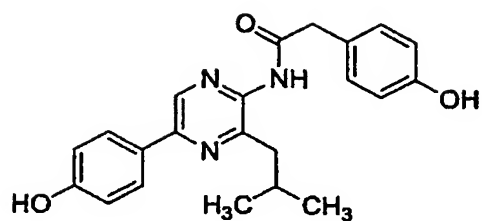
【0173】

【化74】



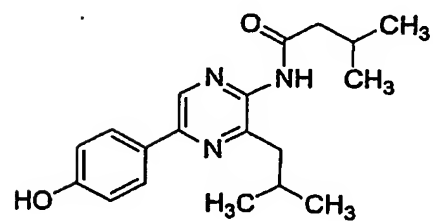
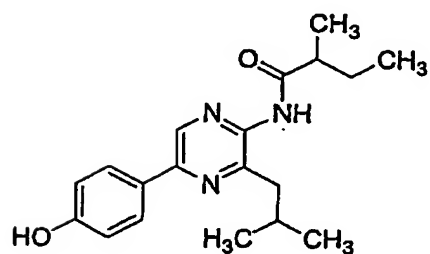
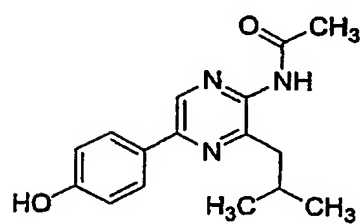
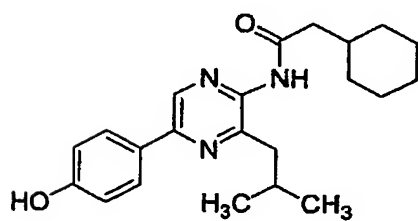
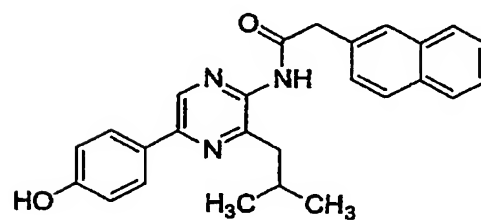
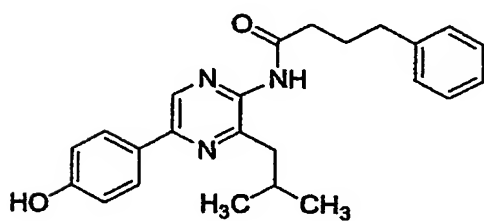
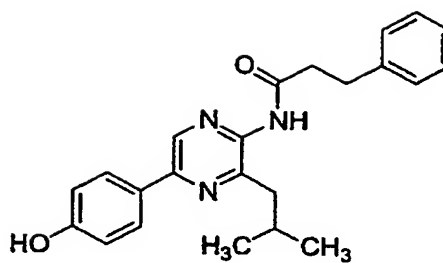
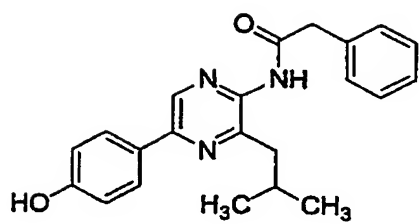
【0174】

【化75】



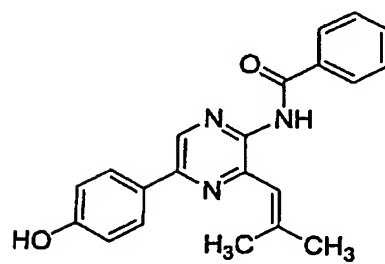
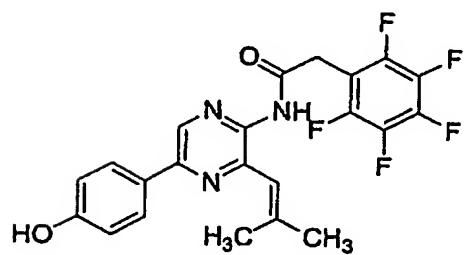
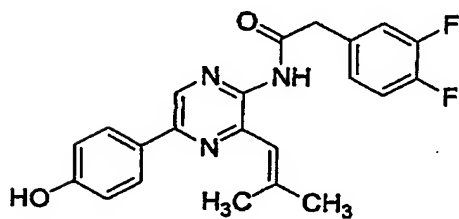
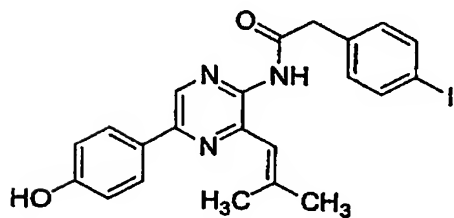
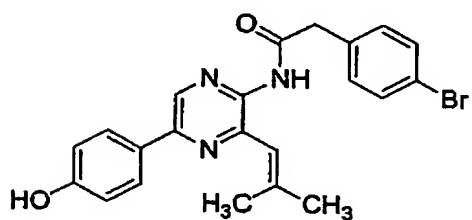
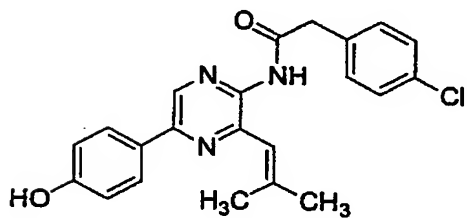
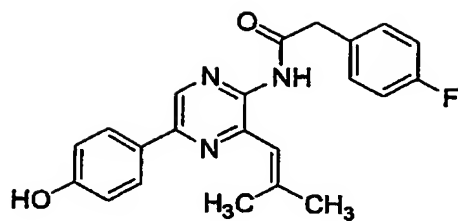
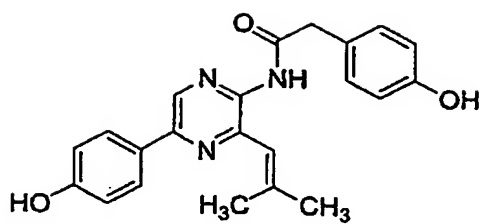
【0175】

【化76】



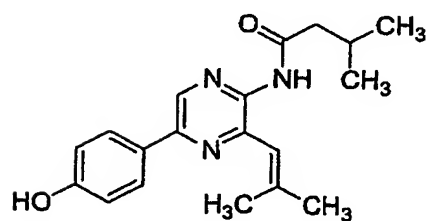
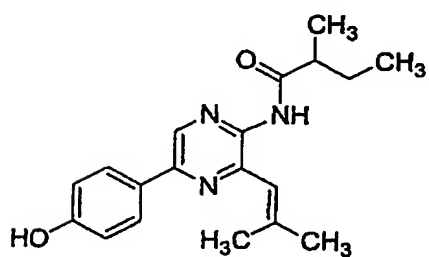
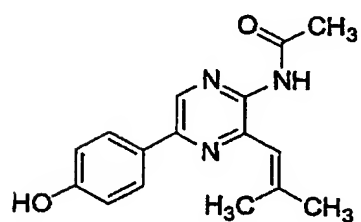
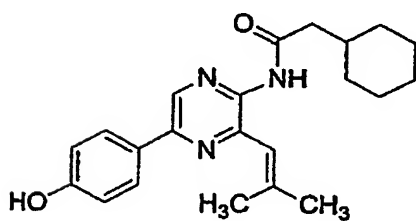
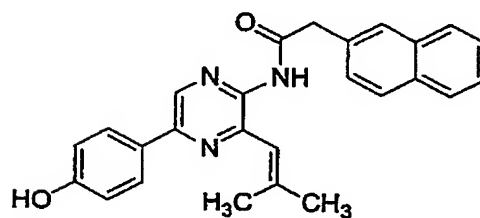
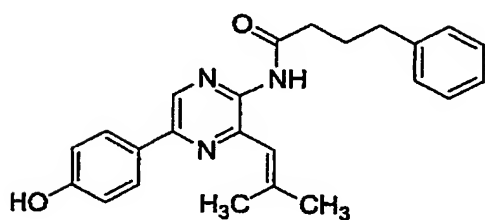
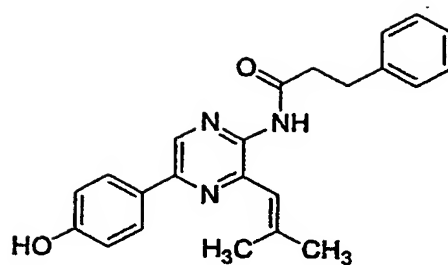
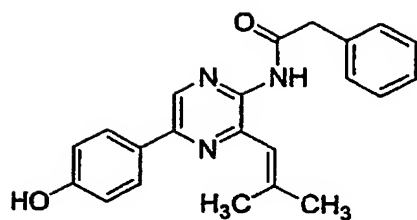
【0176】

【化77】



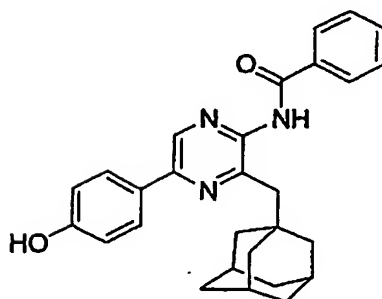
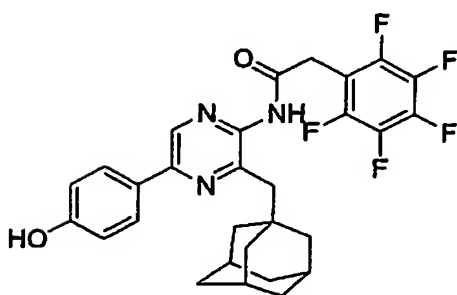
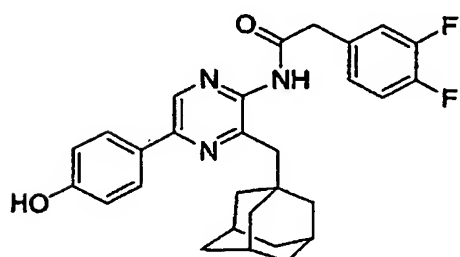
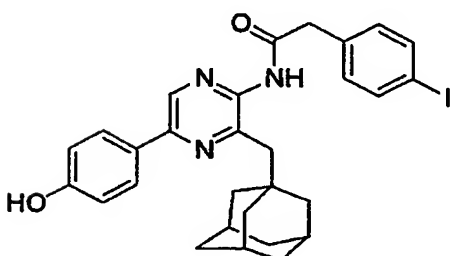
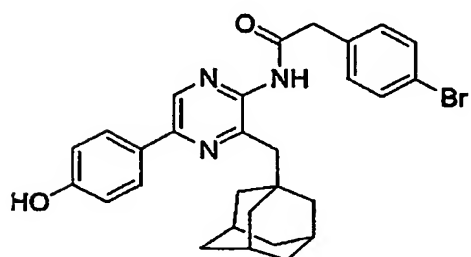
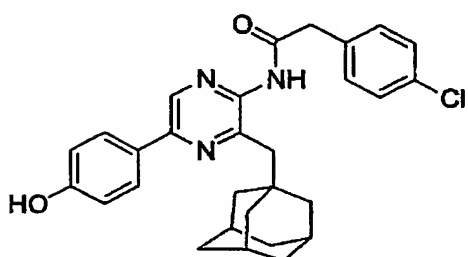
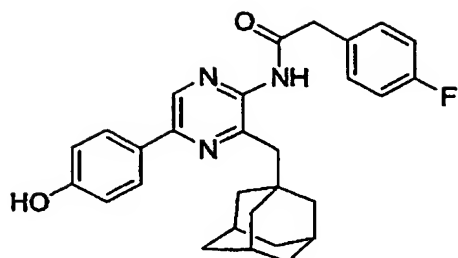
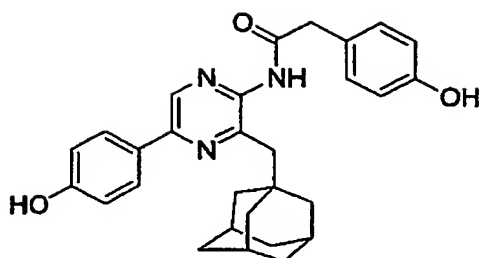
【0177】

【化 78】



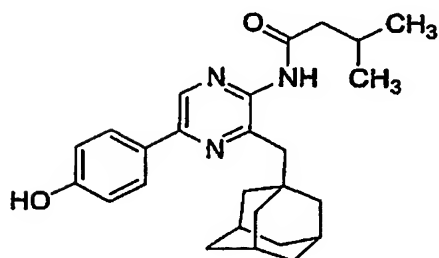
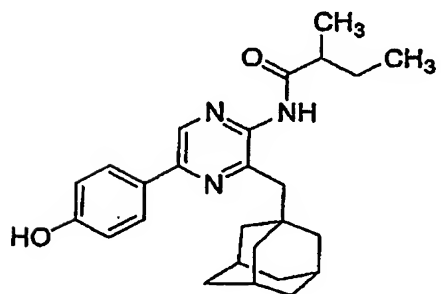
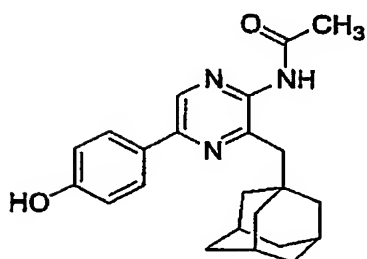
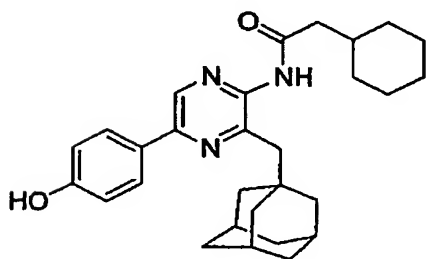
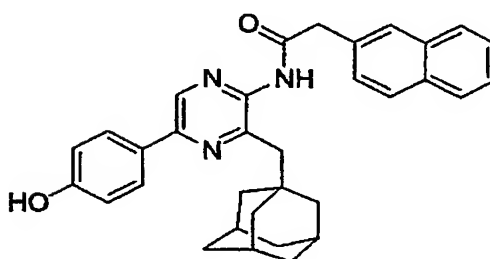
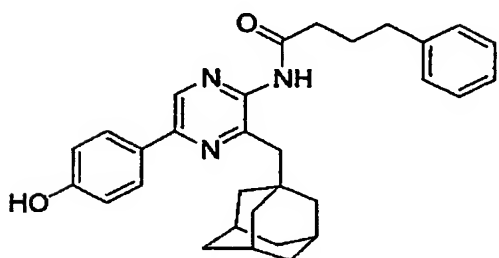
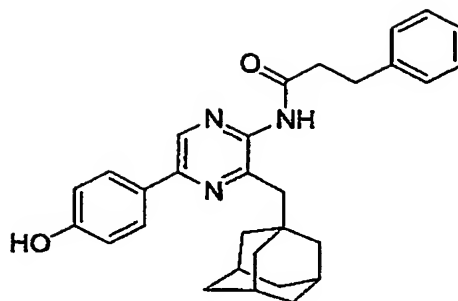
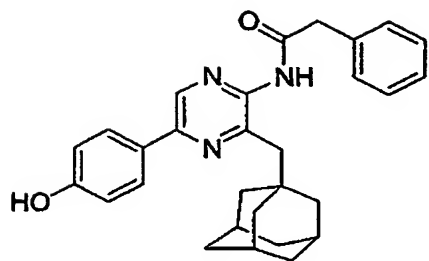
【0178】

【化 79】



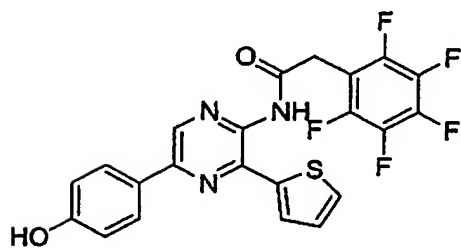
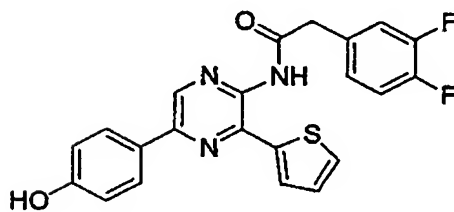
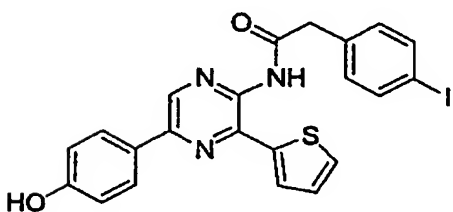
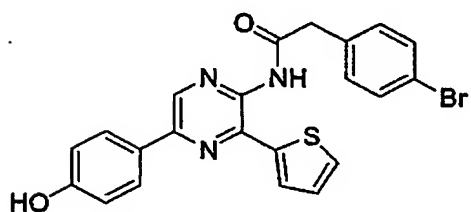
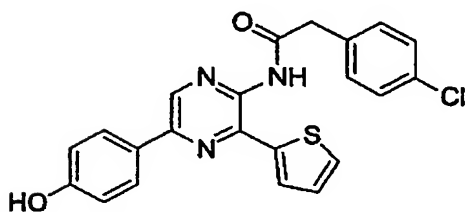
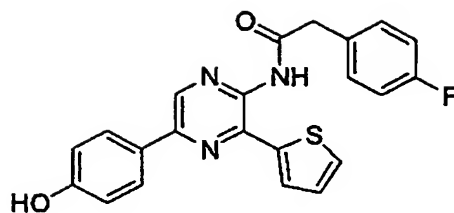
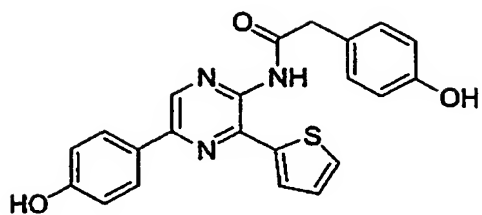
【0179】

【化 80】

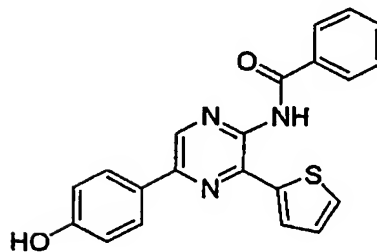


【0180】

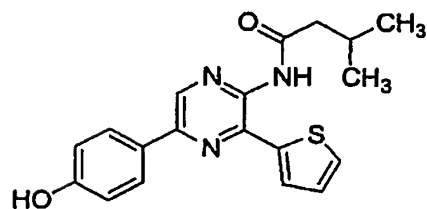
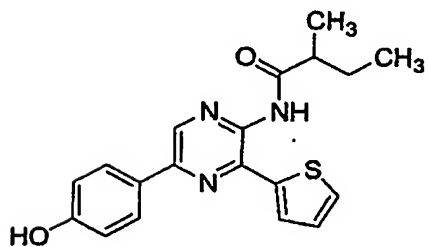
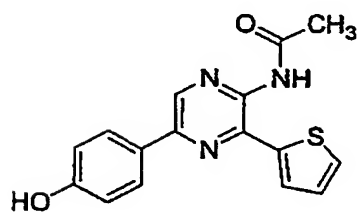
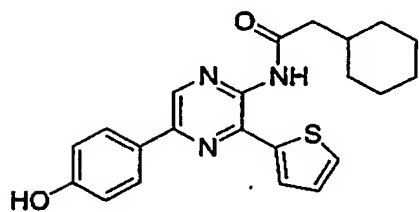
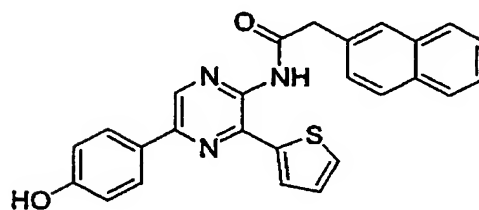
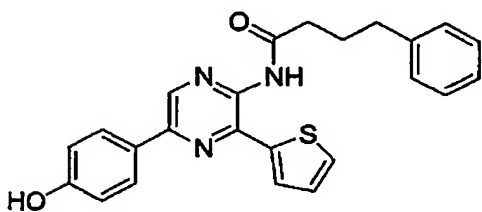
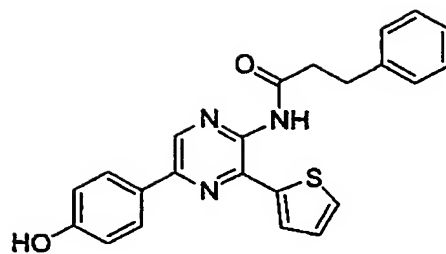
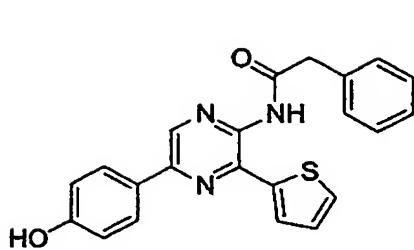
【化81】



【0181】

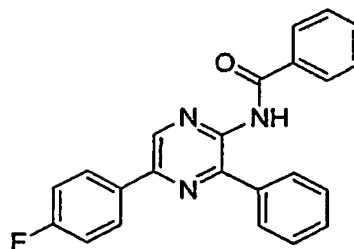
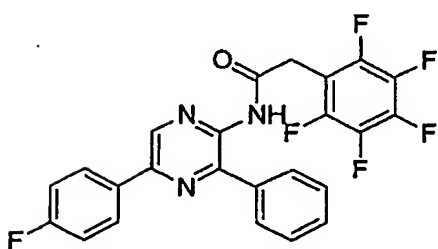
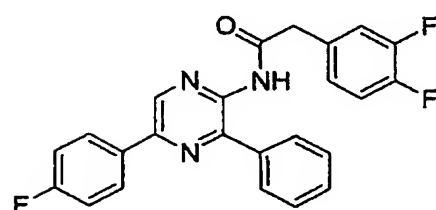
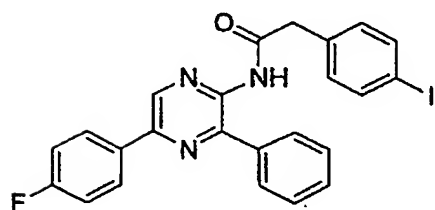
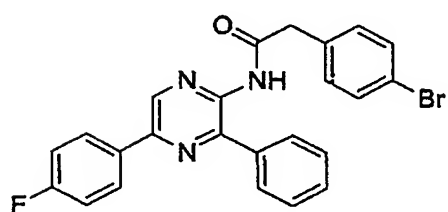
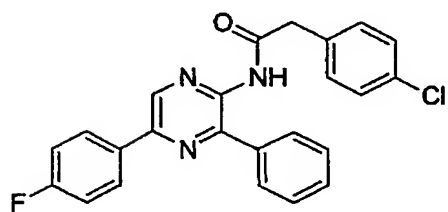
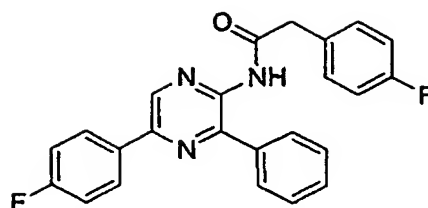
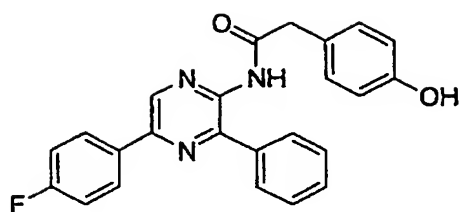


【化 8 2】



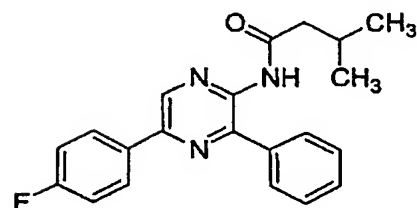
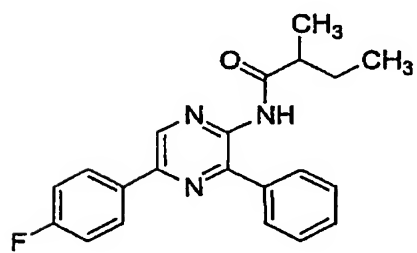
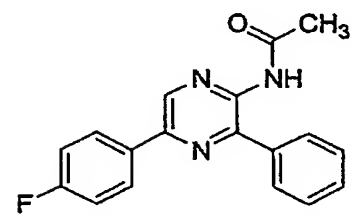
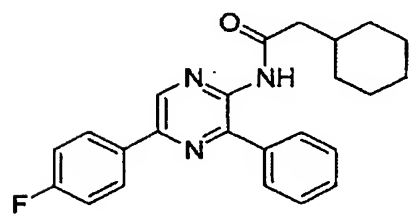
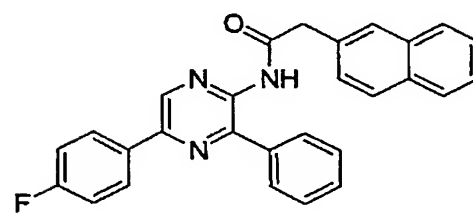
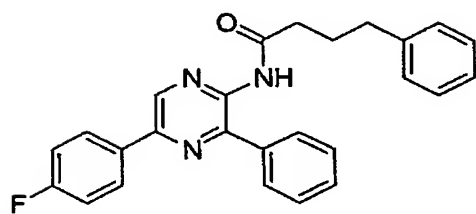
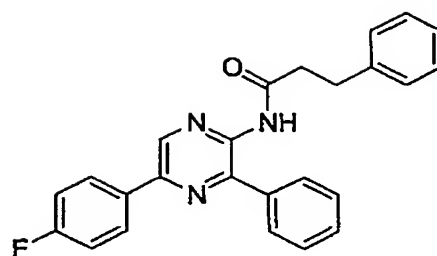
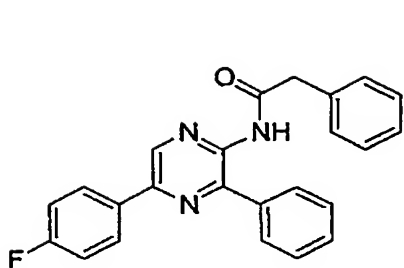
【0182】

【化 83】



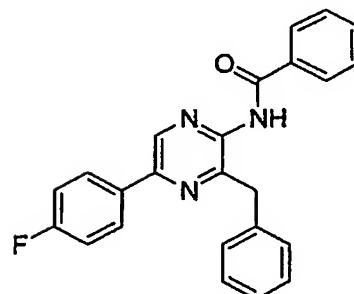
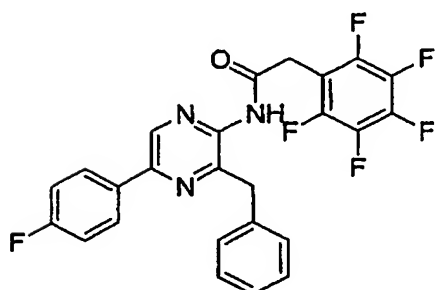
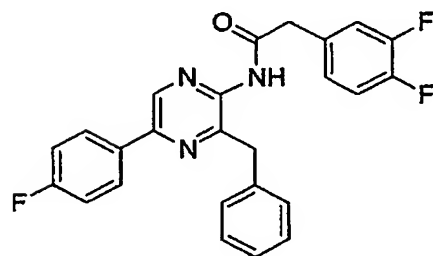
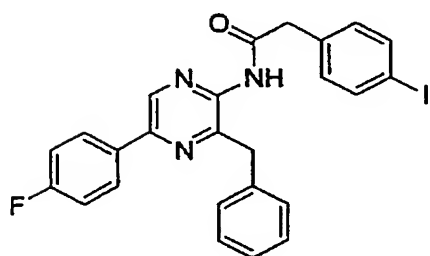
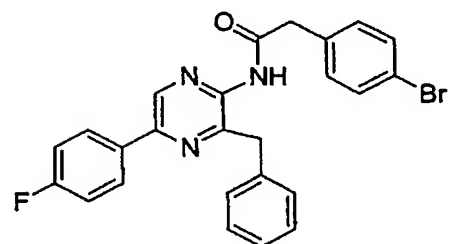
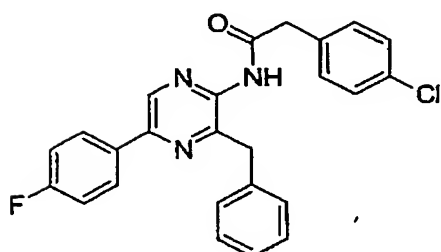
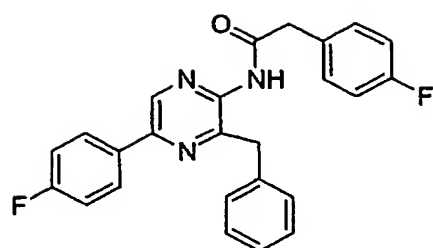
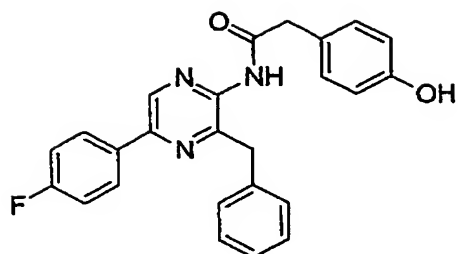
【0183】

【化 8 4】



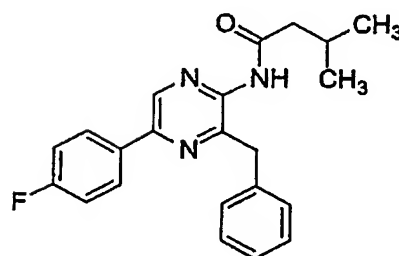
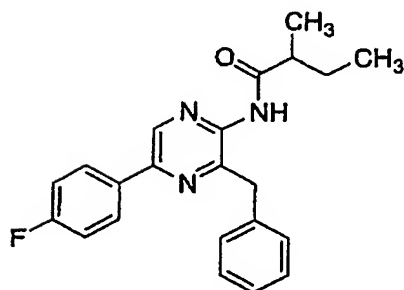
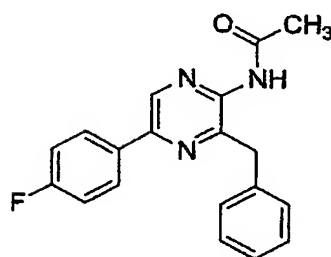
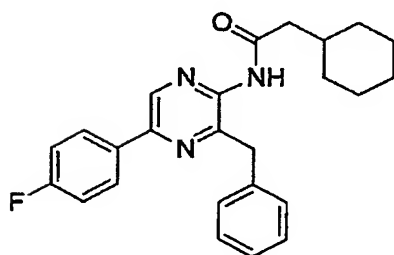
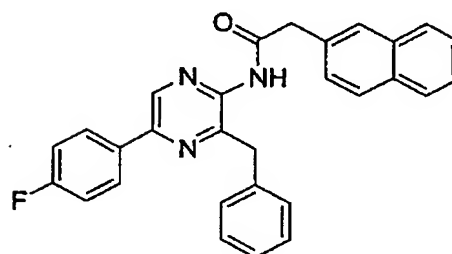
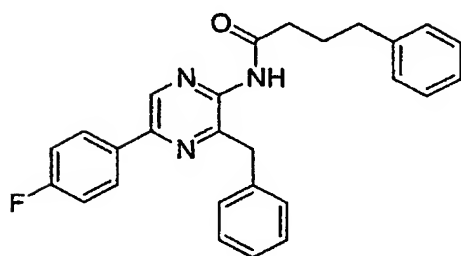
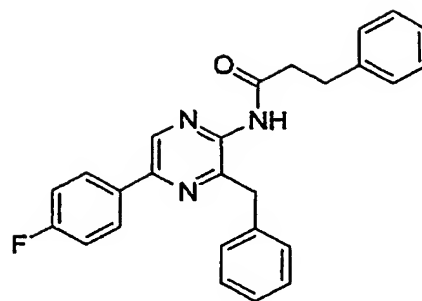
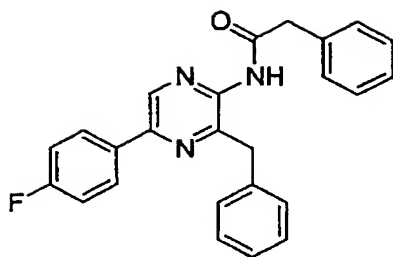
【0184】

【化 85】



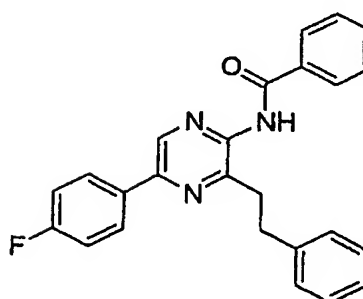
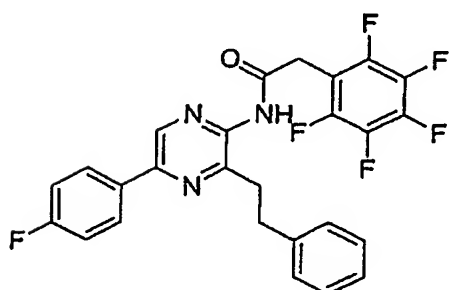
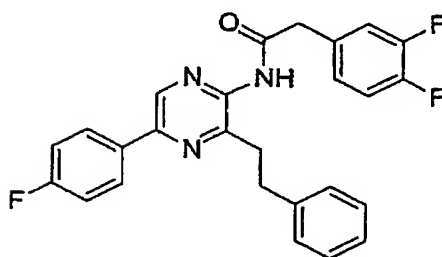
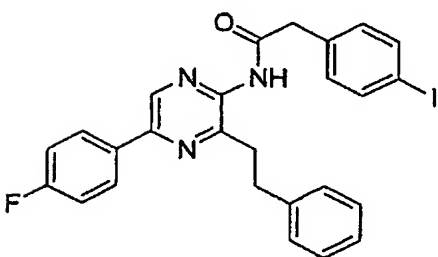
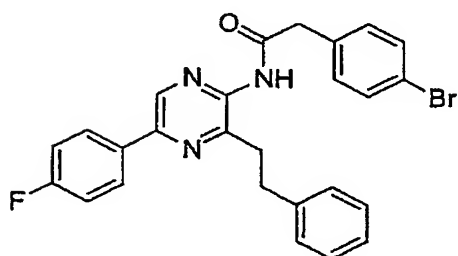
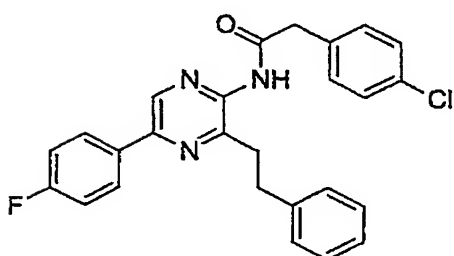
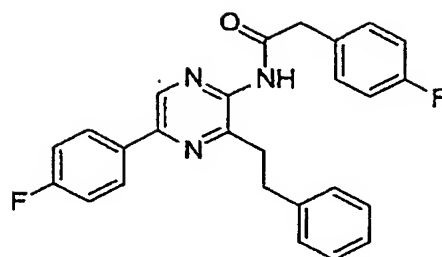
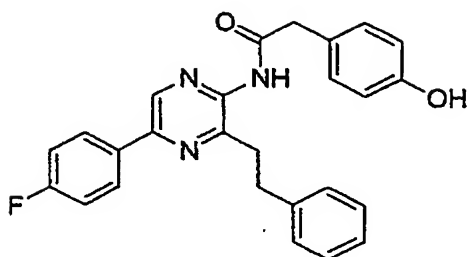
【0185】

【化 86】



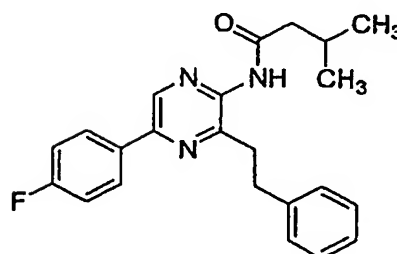
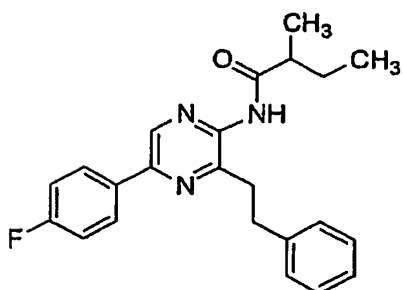
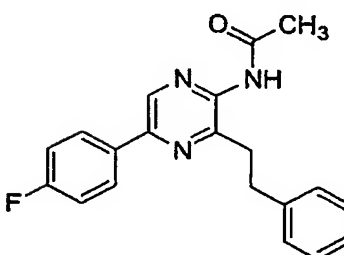
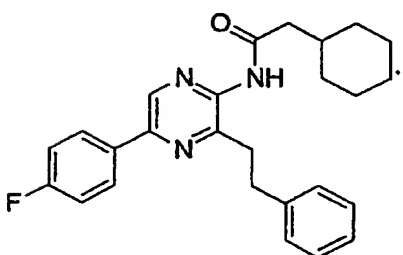
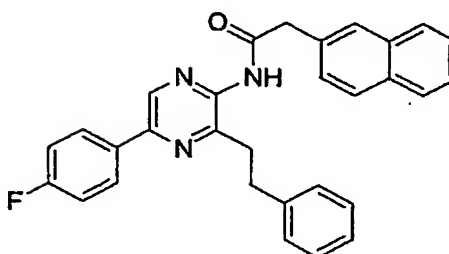
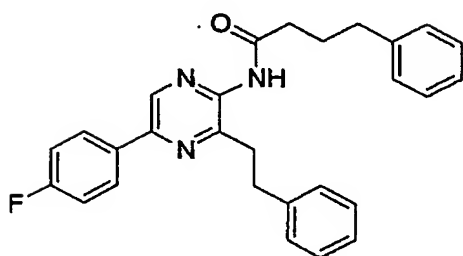
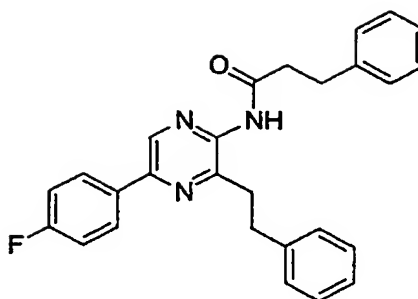
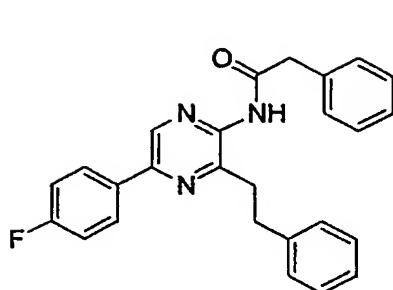
【0186】

【化87】



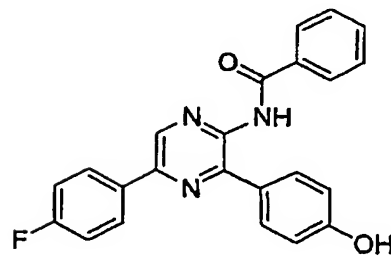
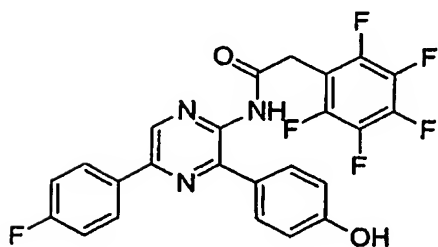
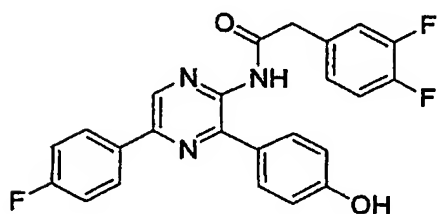
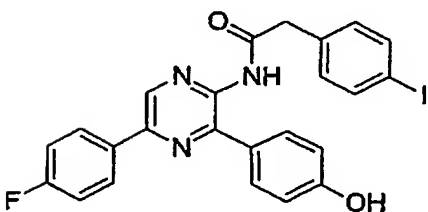
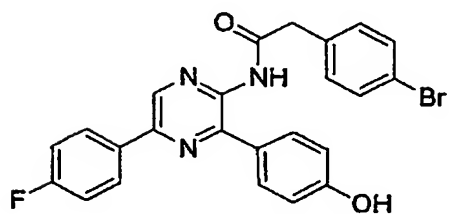
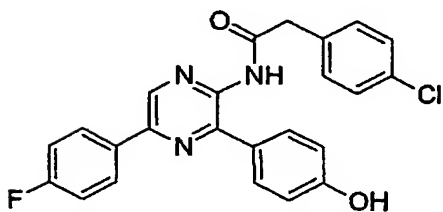
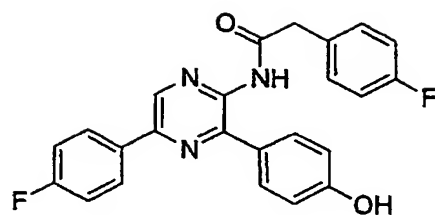
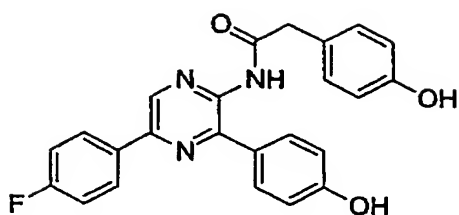
【0187】

【化88】



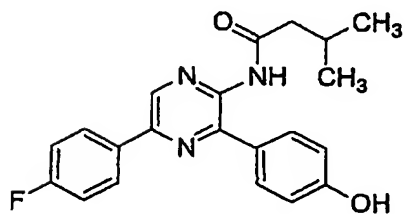
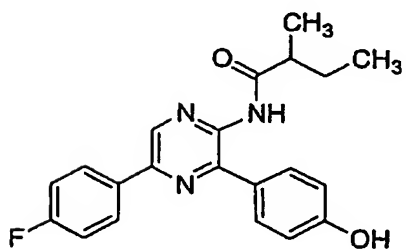
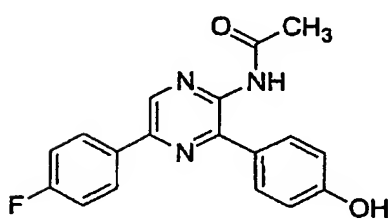
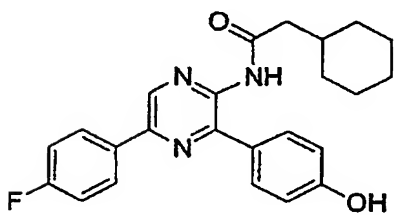
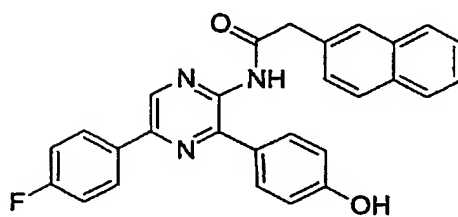
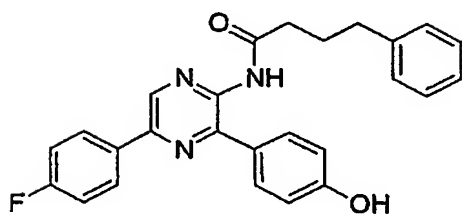
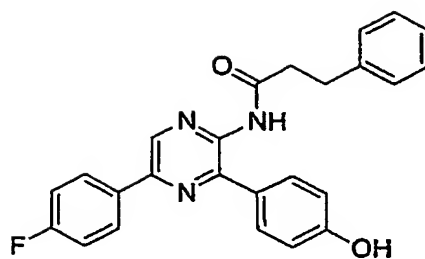
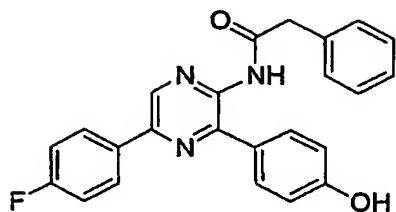
【0188】

【化89】



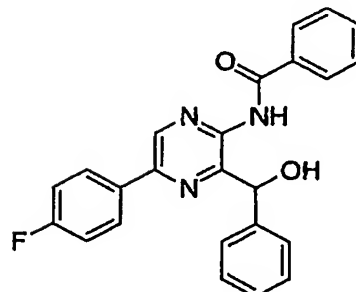
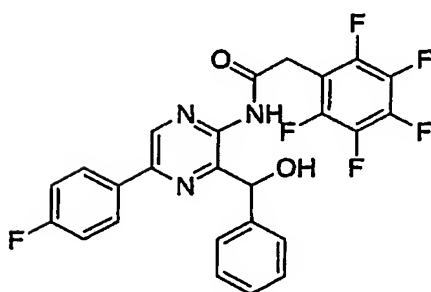
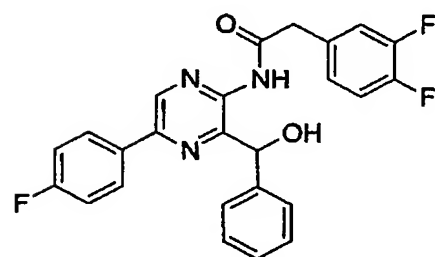
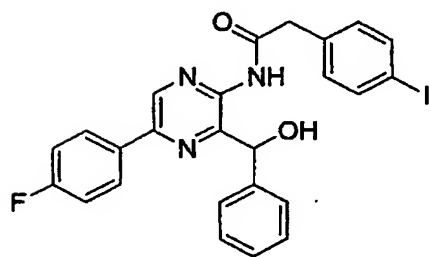
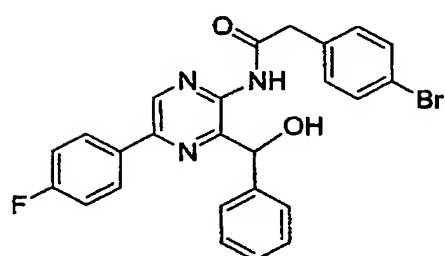
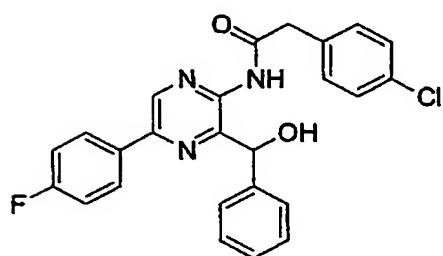
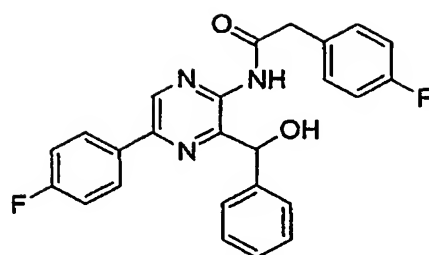
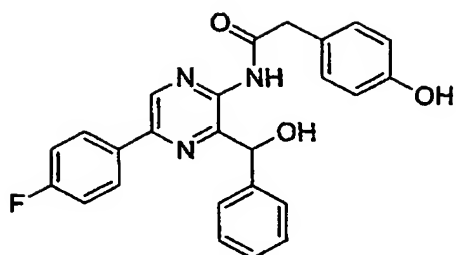
【0189】

【化90】



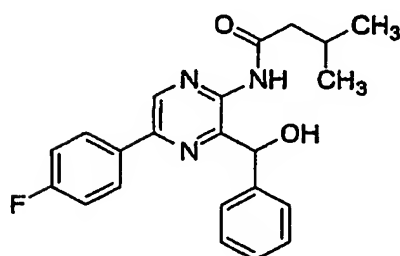
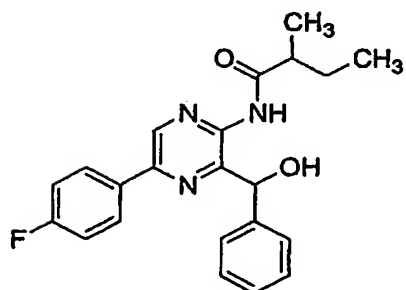
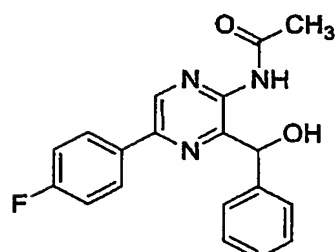
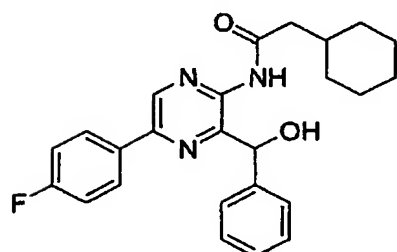
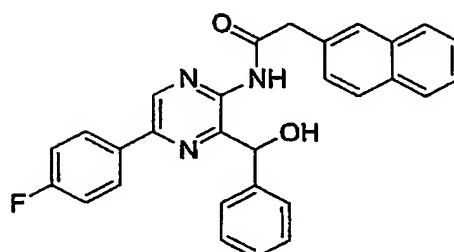
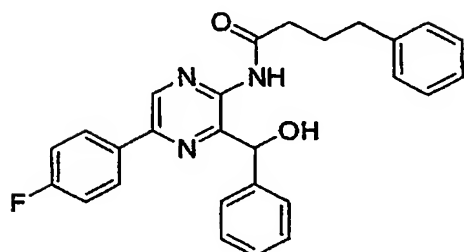
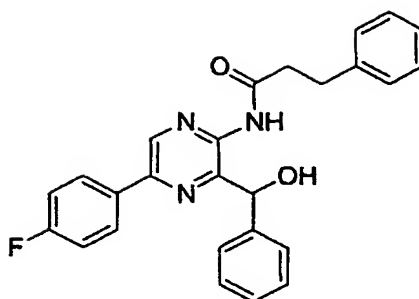
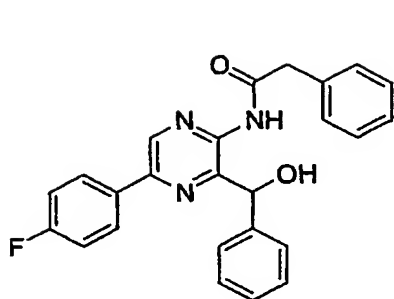
【0190】

【化91】



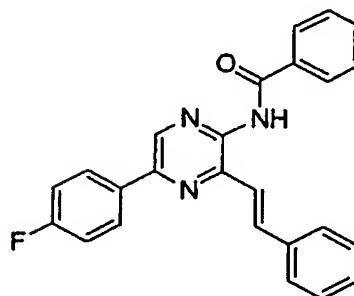
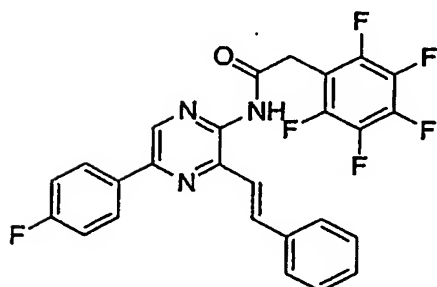
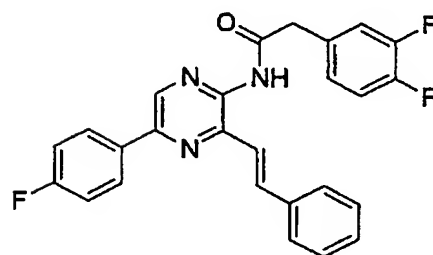
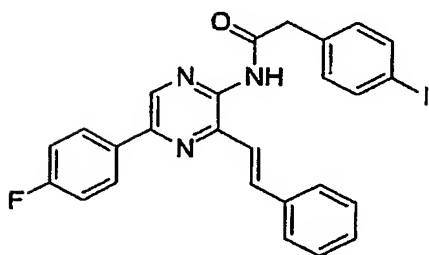
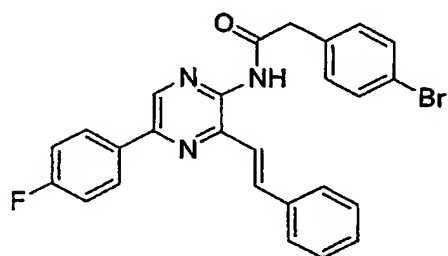
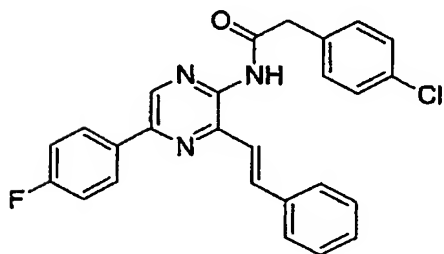
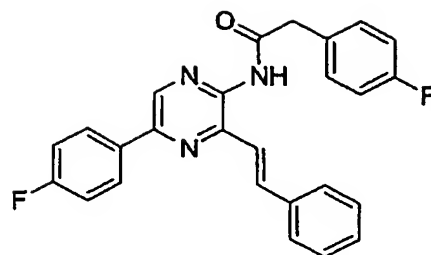
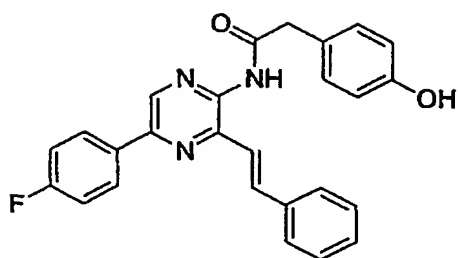
【0191】

【化92】



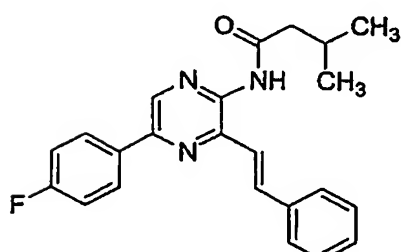
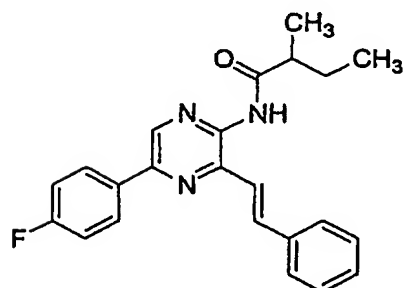
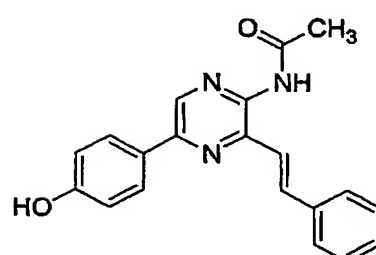
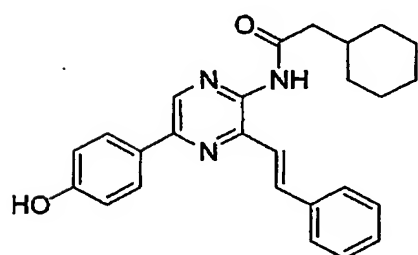
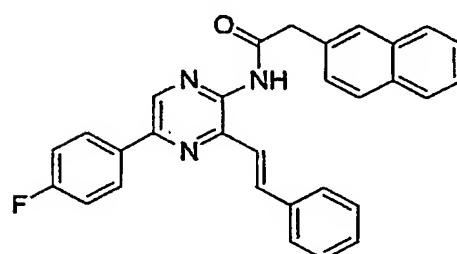
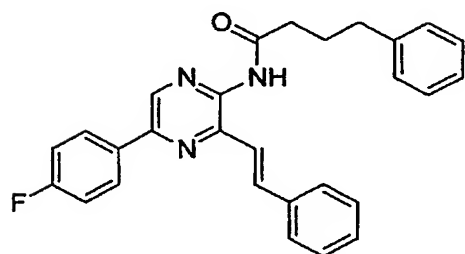
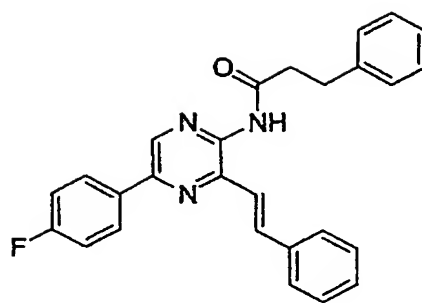
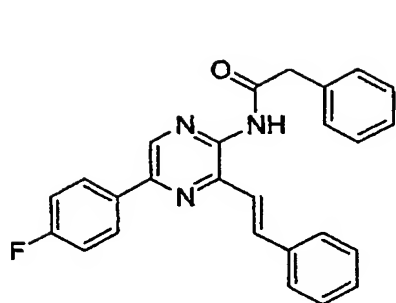
【0192】

【化93】



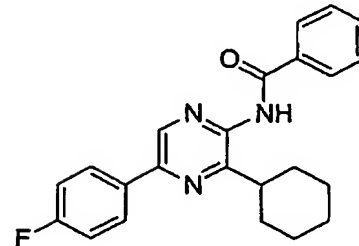
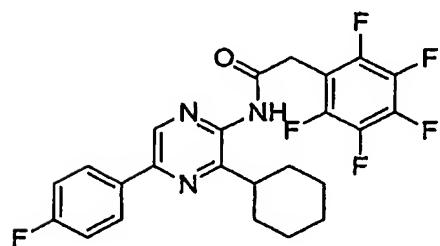
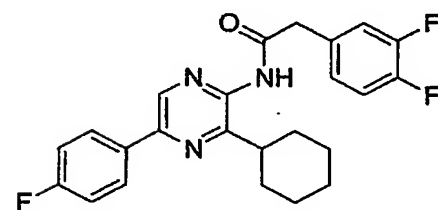
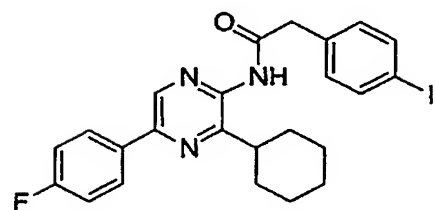
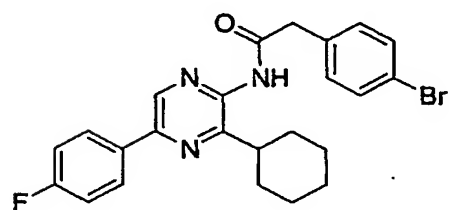
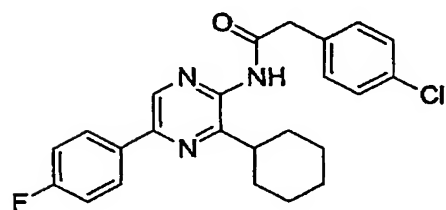
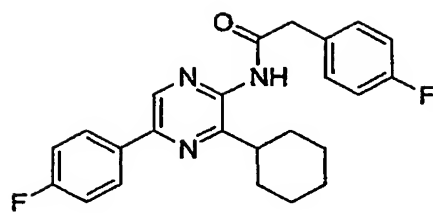
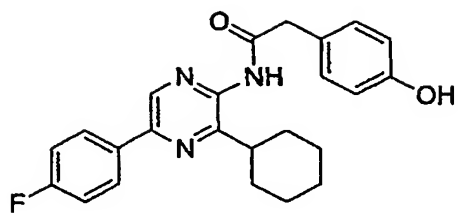
【0193】

【化94】



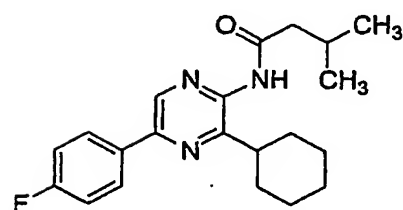
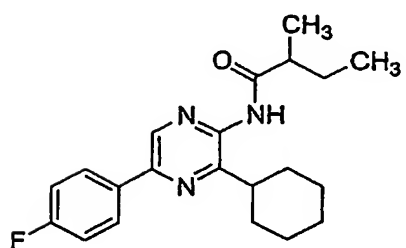
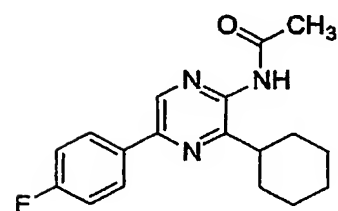
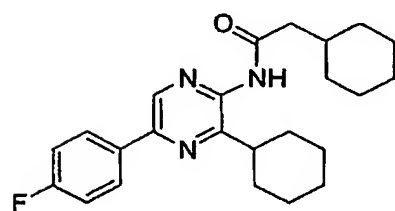
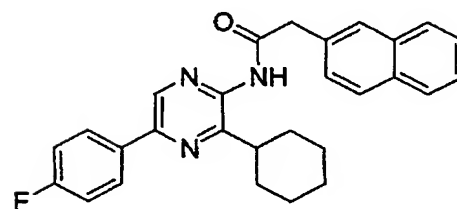
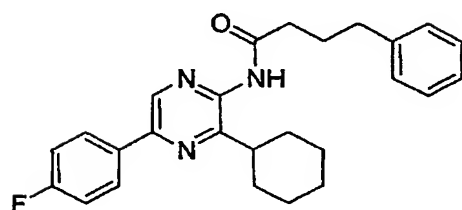
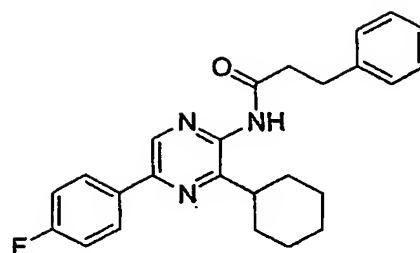
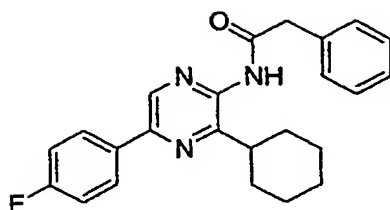
【0194】

【化95】



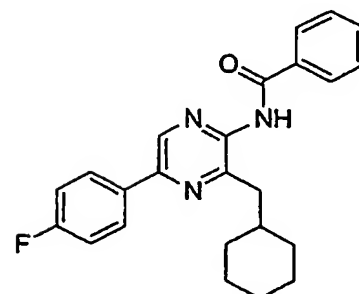
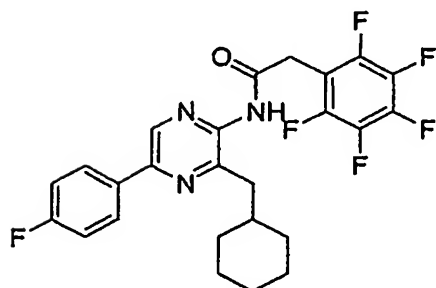
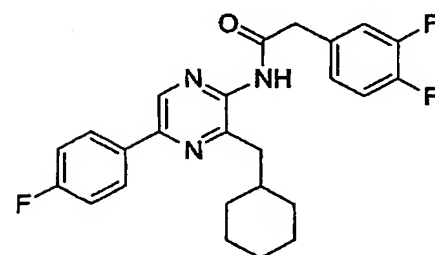
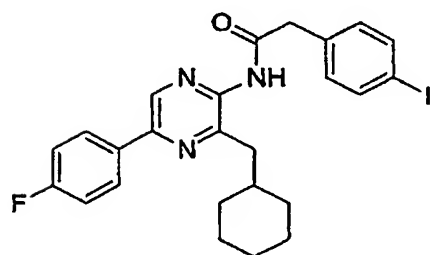
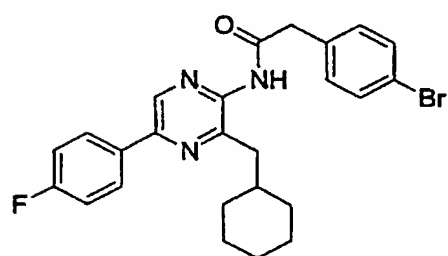
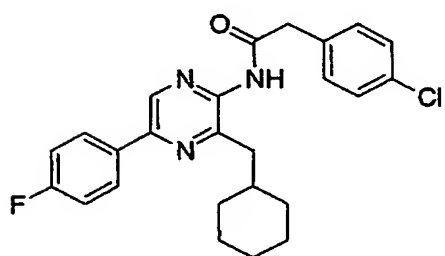
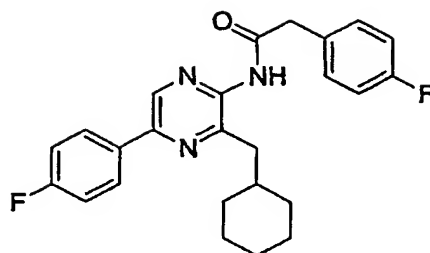
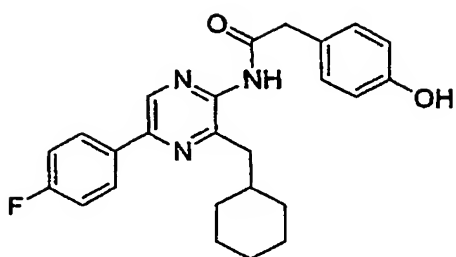
【0195】

【化96】



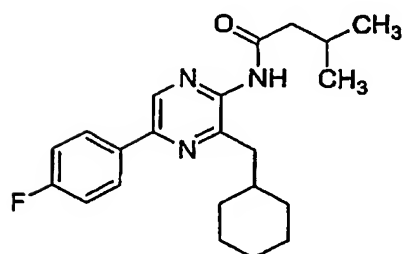
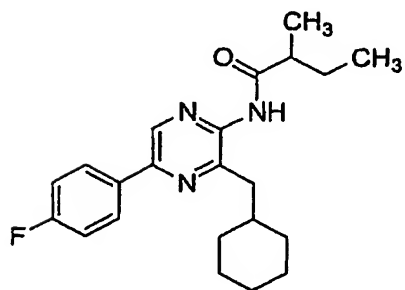
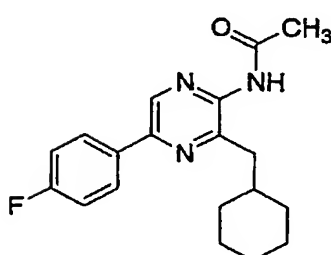
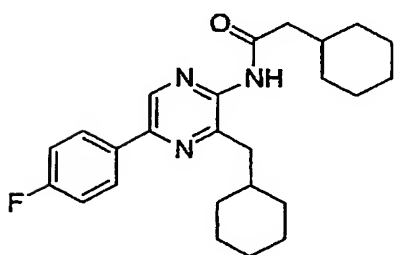
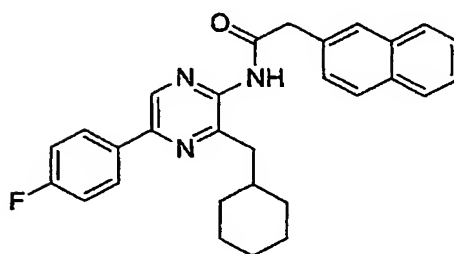
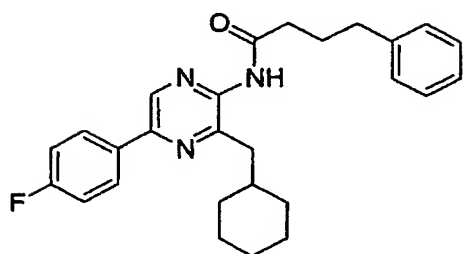
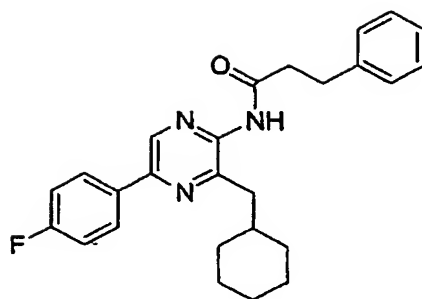
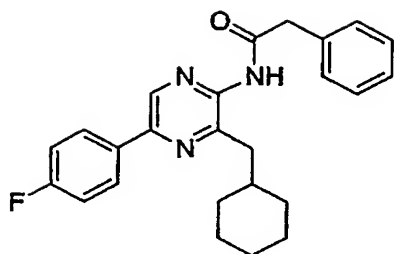
【0196】

【化97】



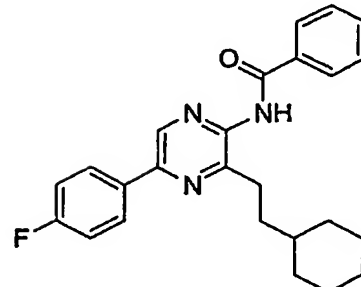
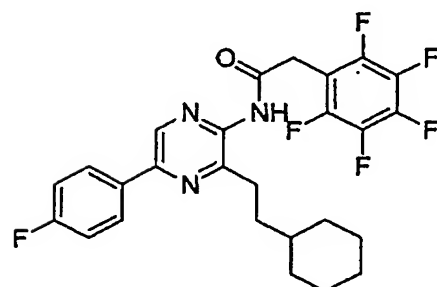
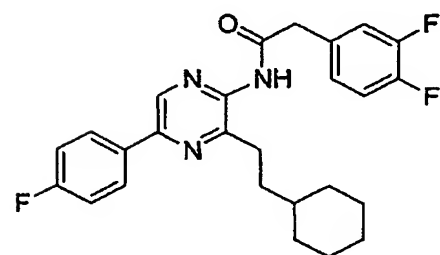
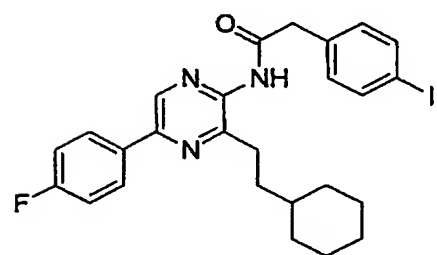
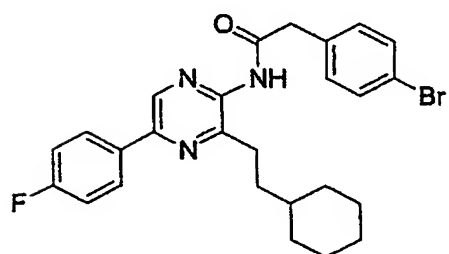
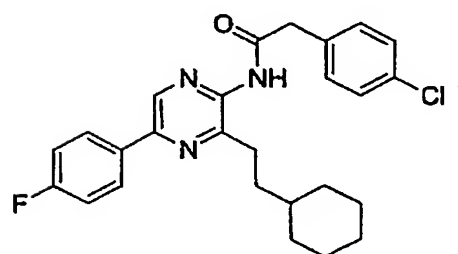
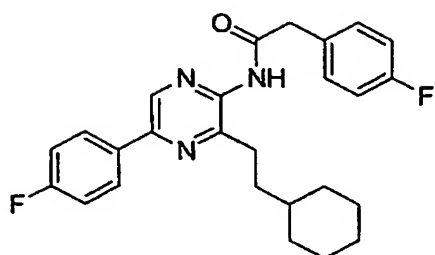
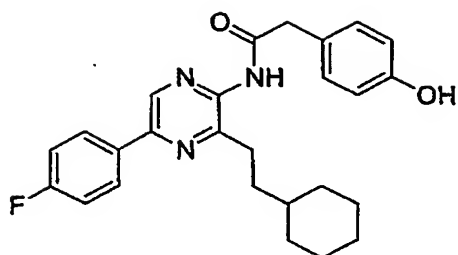
【0197】

【化98】



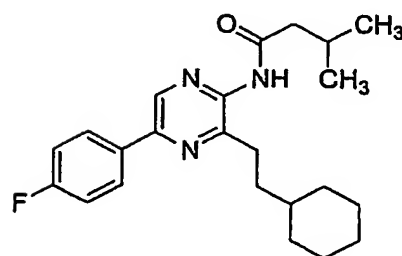
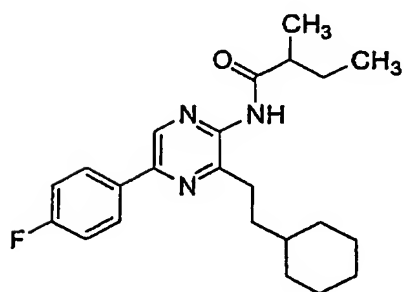
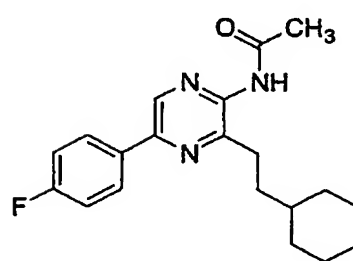
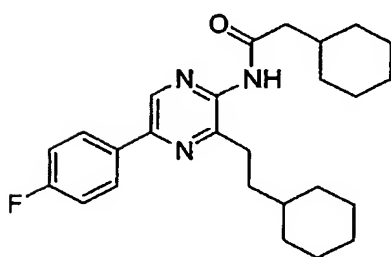
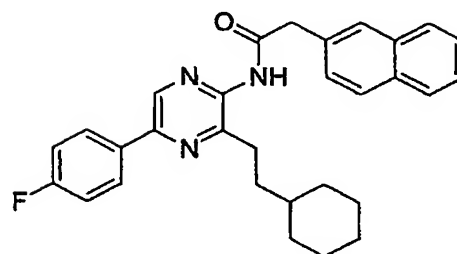
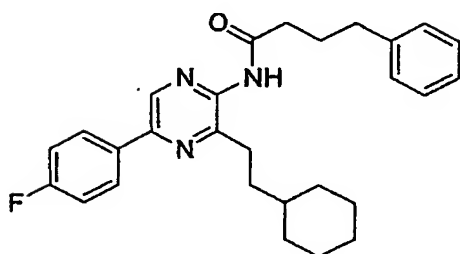
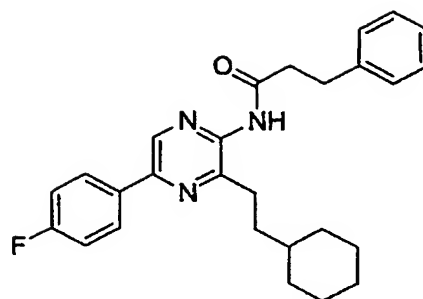
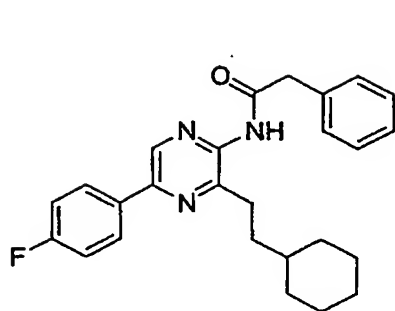
【0198】

【化99】



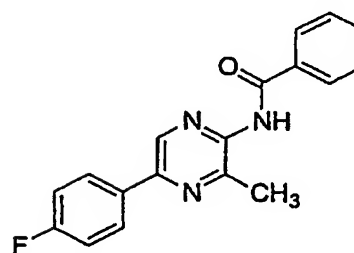
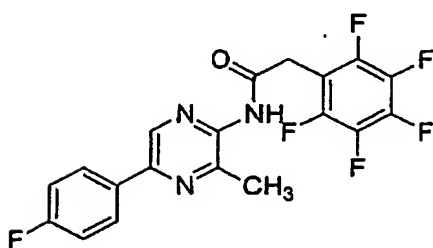
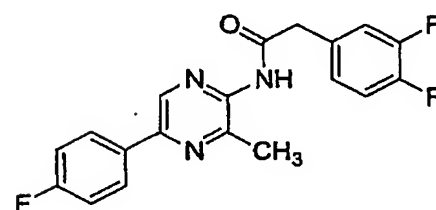
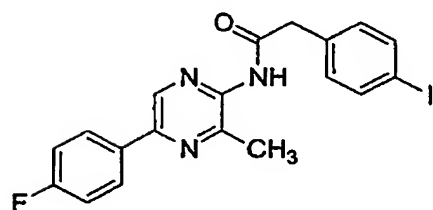
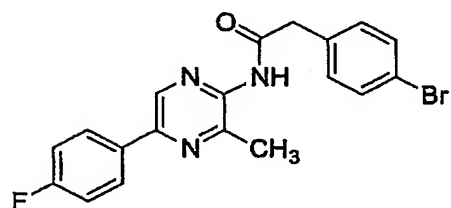
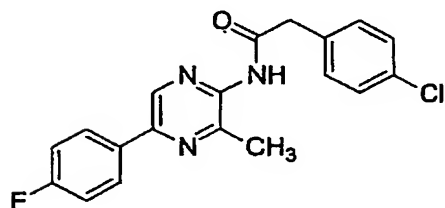
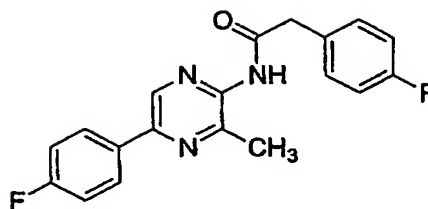
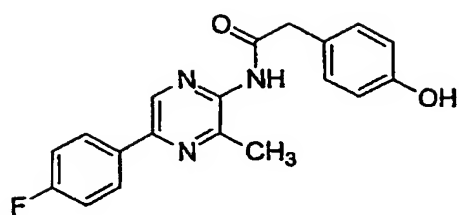
【0199】

【化100】



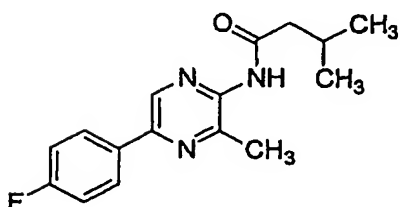
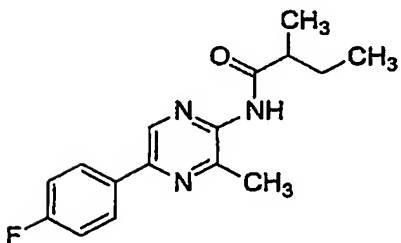
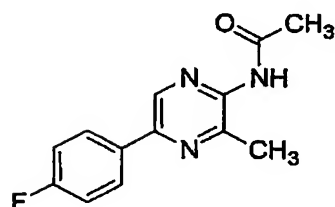
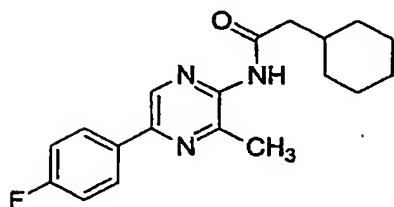
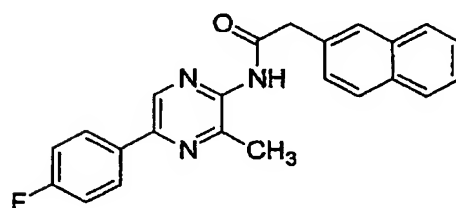
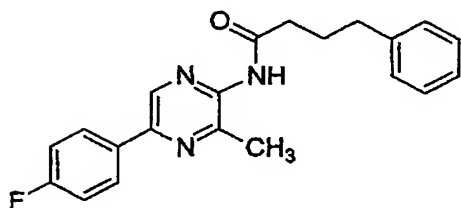
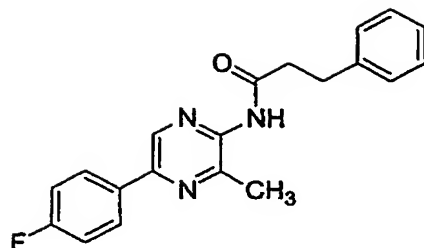
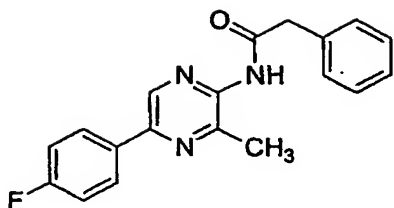
【0200】

【化101】



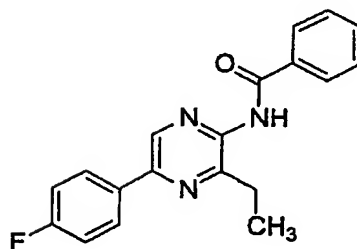
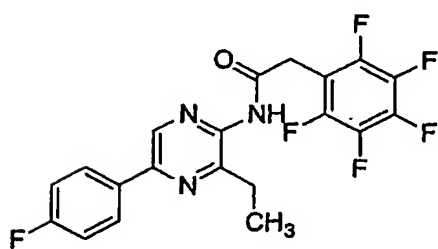
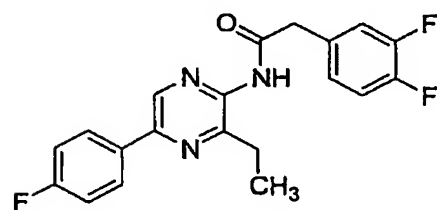
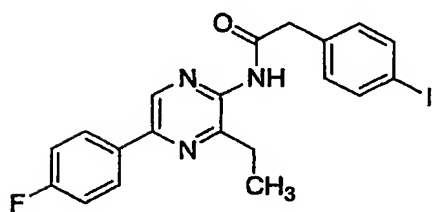
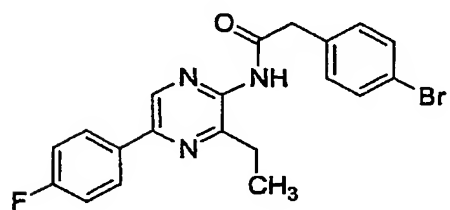
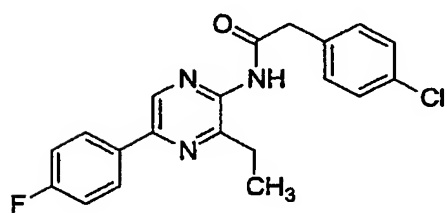
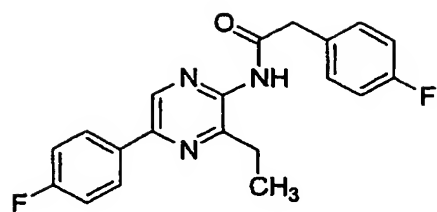
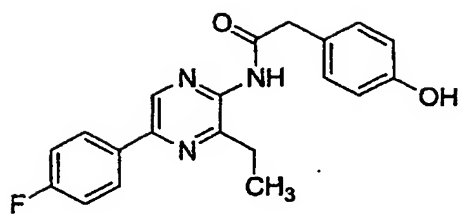
【0201】

【化102】



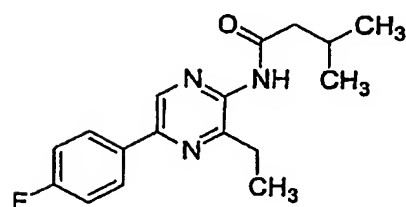
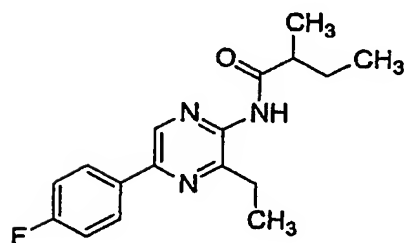
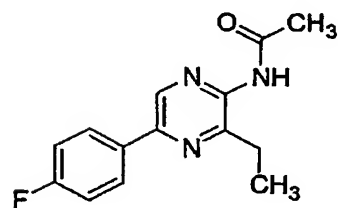
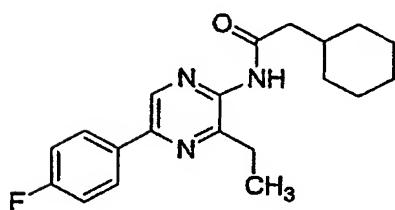
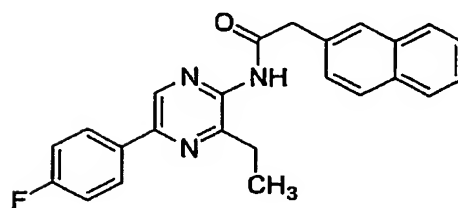
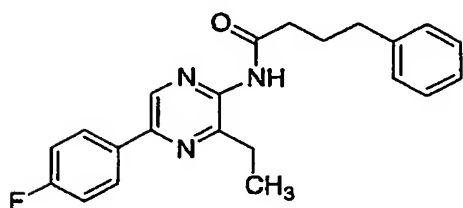
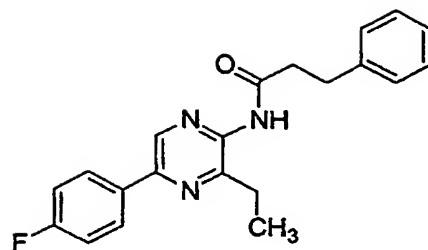
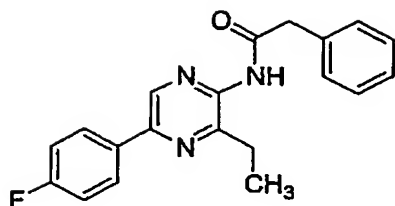
【0202】

【化103】



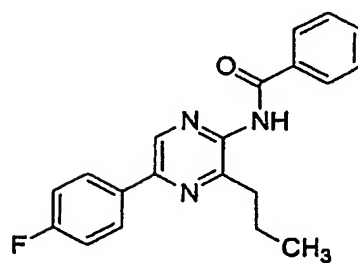
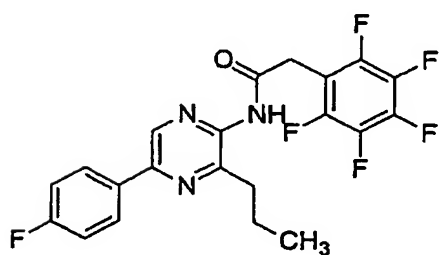
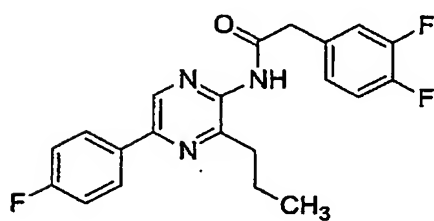
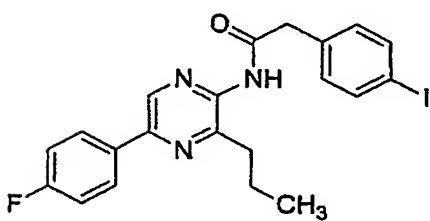
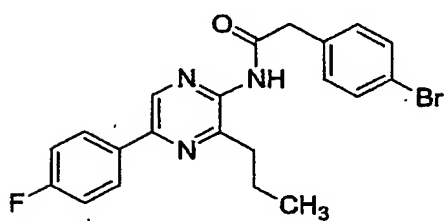
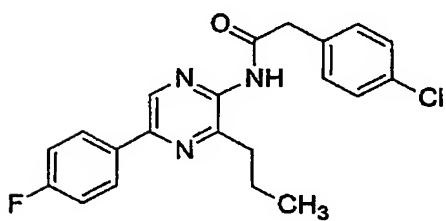
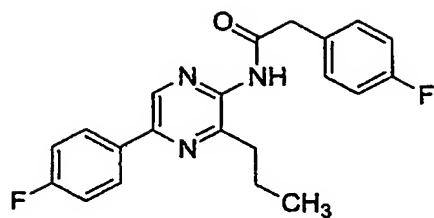
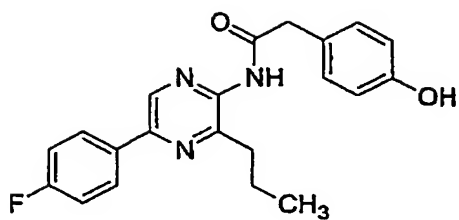
【0203】

【化104】



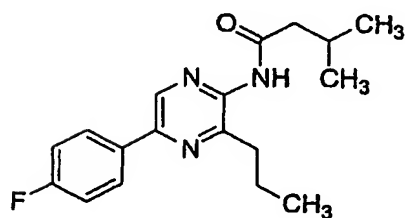
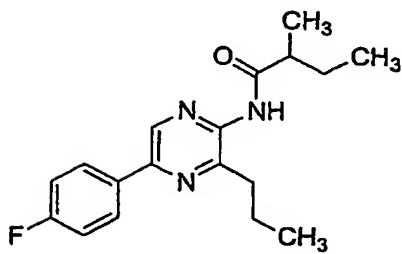
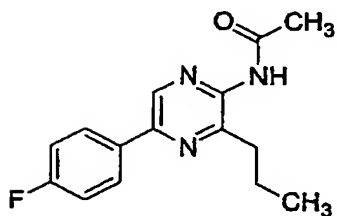
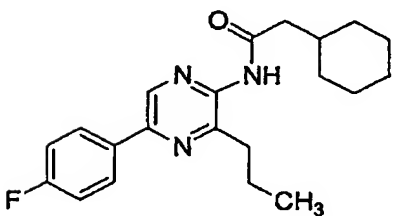
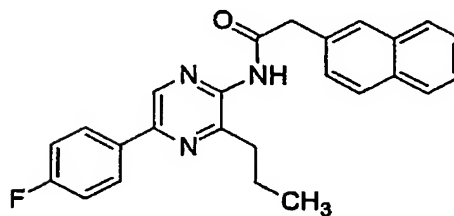
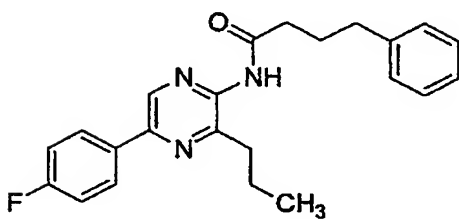
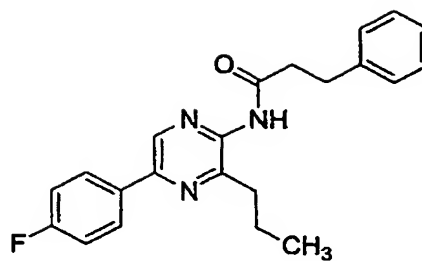
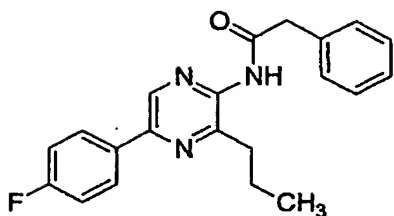
【0204】

【化105】



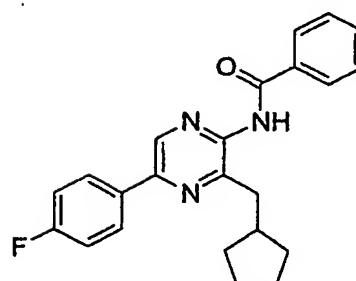
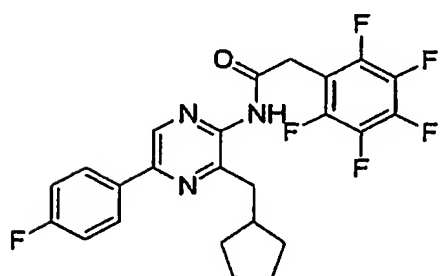
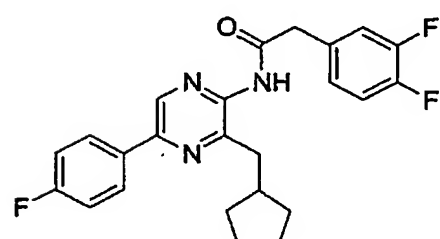
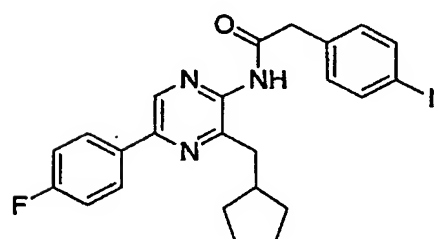
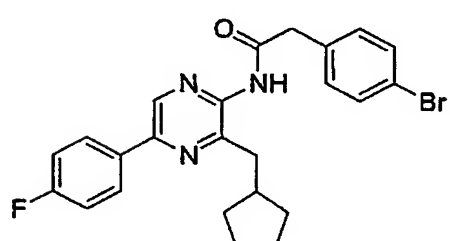
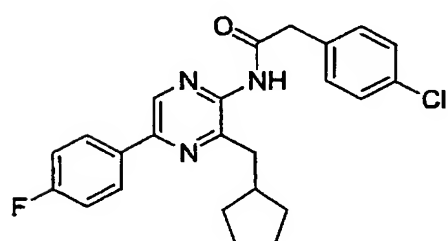
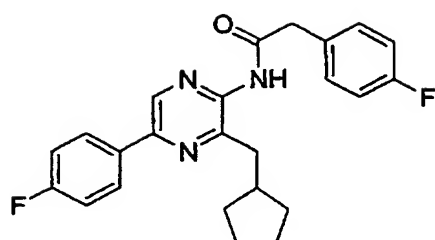
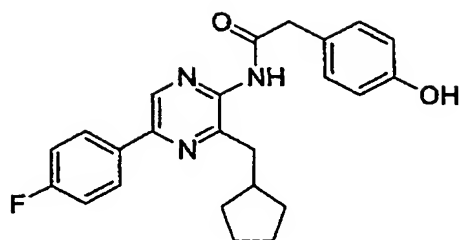
【0205】

【化106】



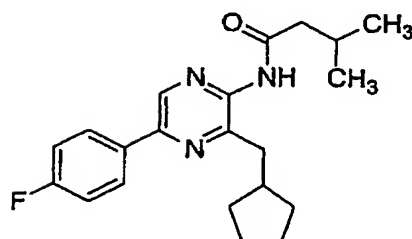
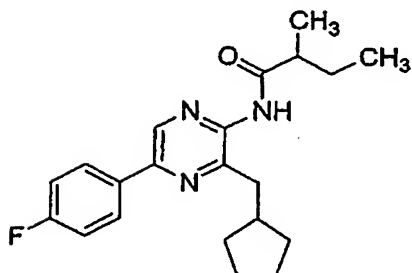
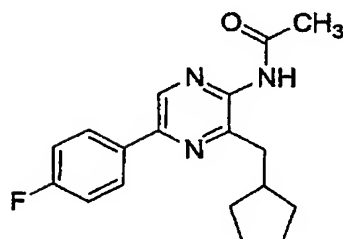
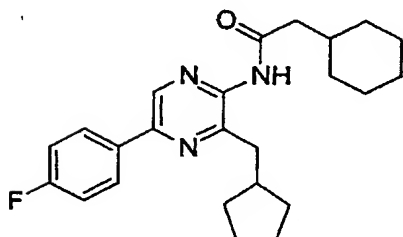
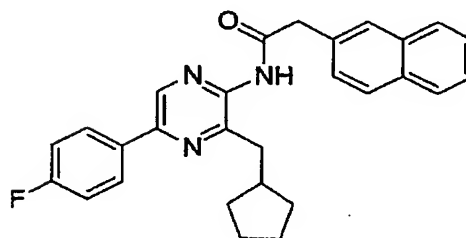
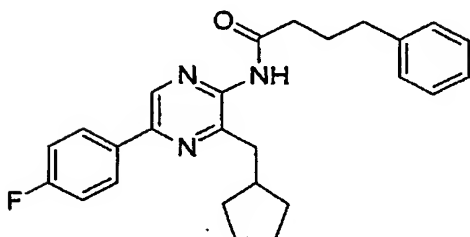
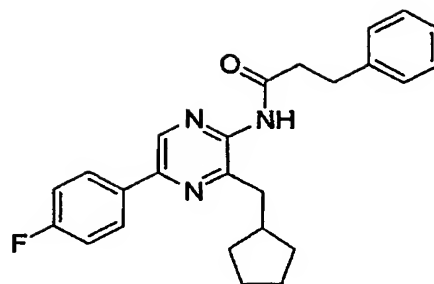
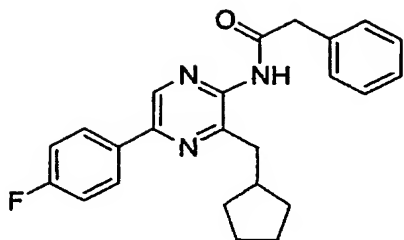
【0206】

【化107】



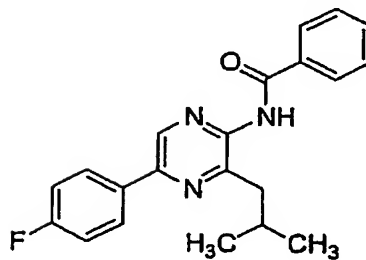
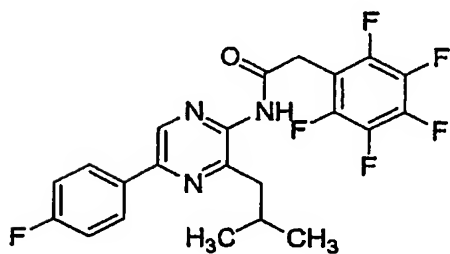
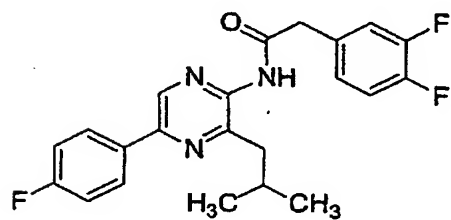
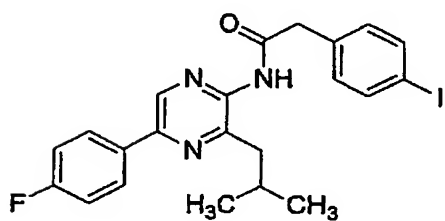
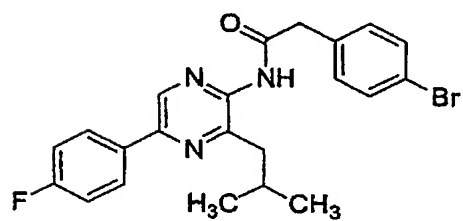
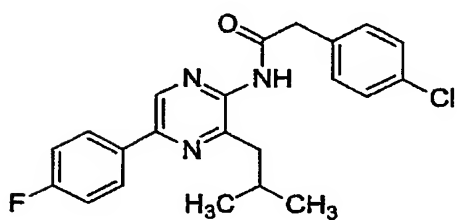
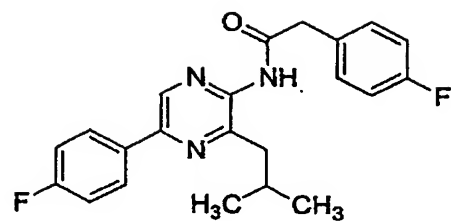
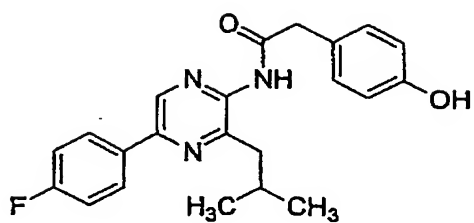
【0207】

【化108】



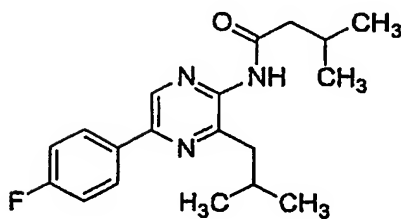
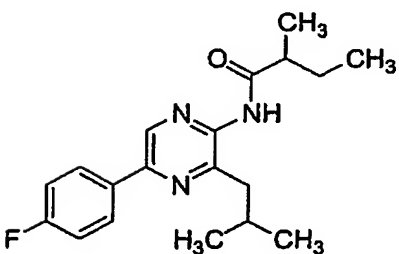
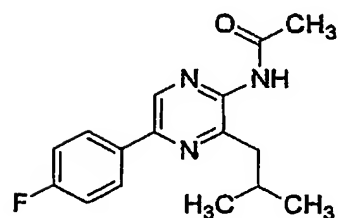
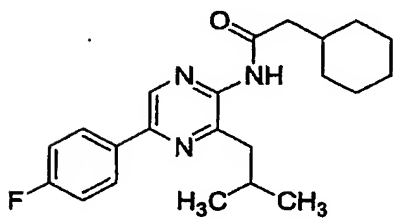
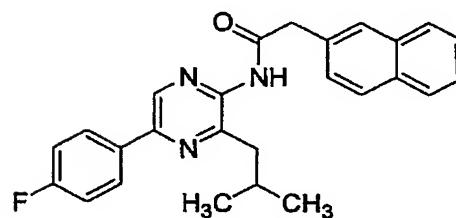
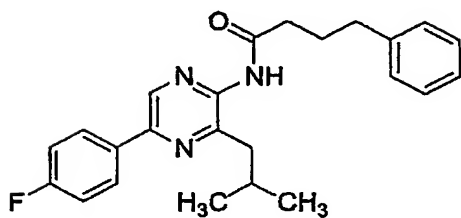
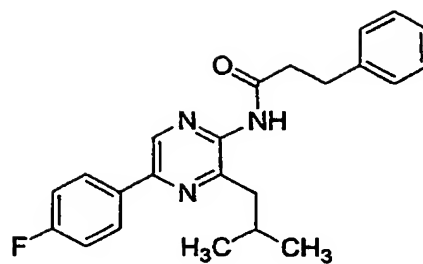
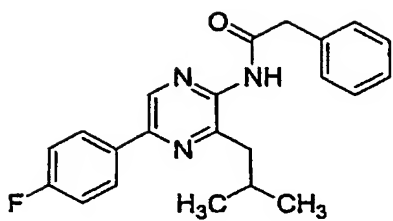
【0208】

【化109】



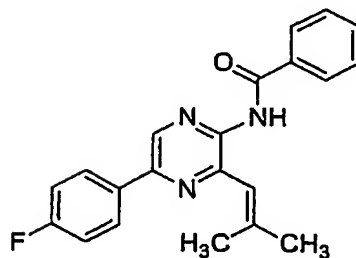
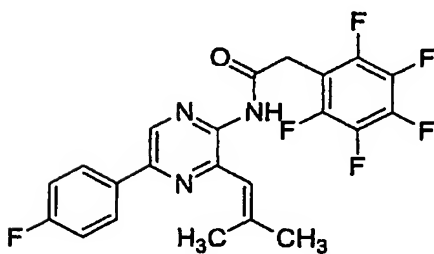
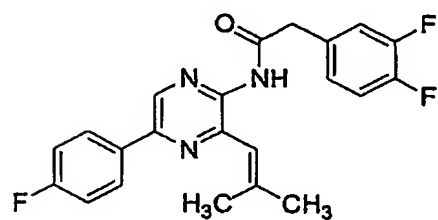
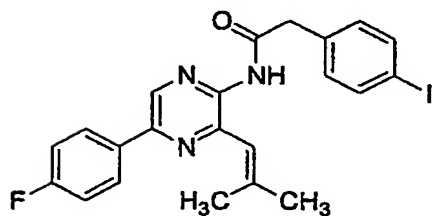
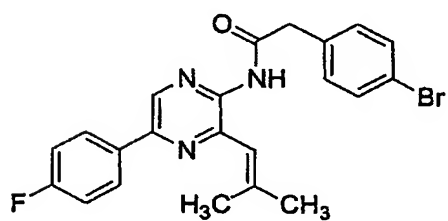
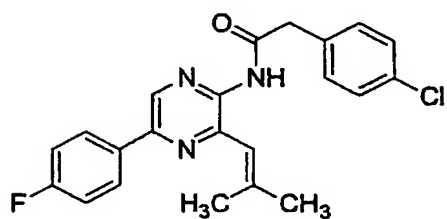
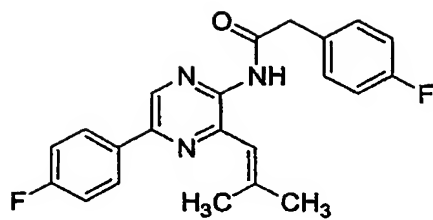
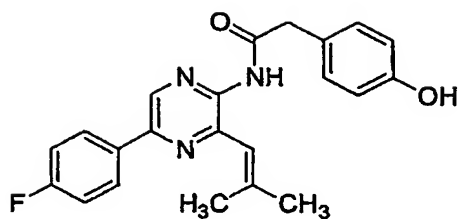
【0209】

【化110】



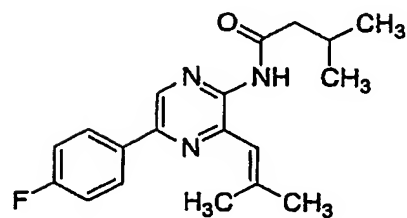
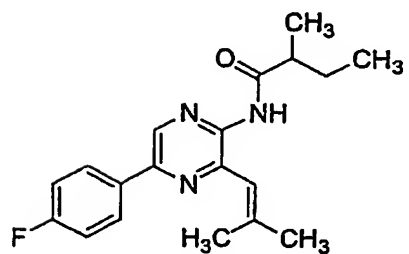
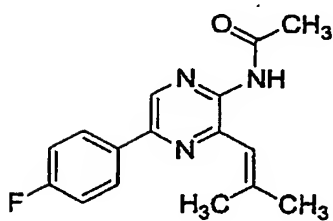
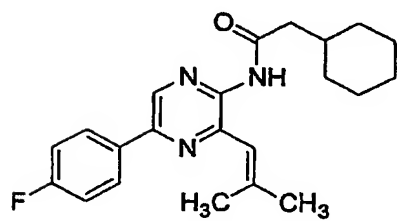
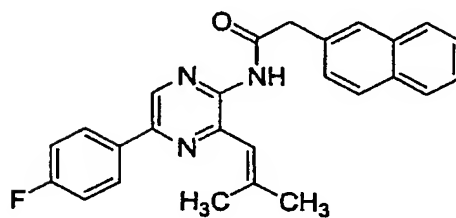
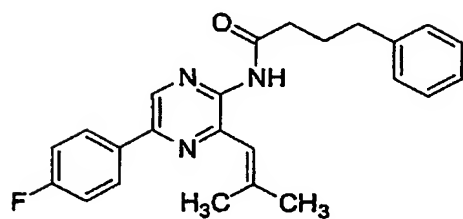
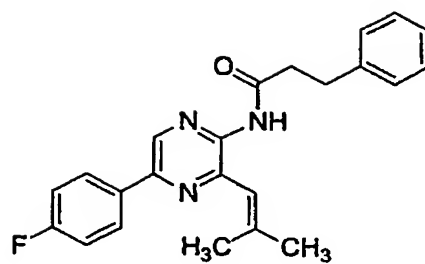
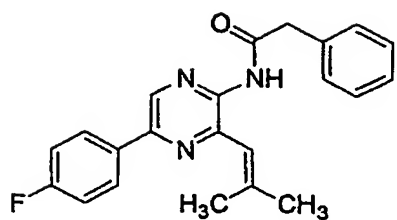
【0210】

【化111】



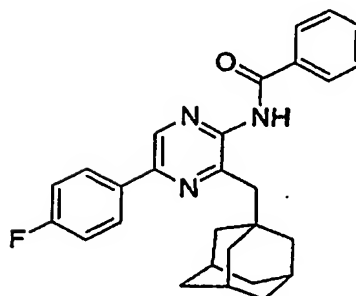
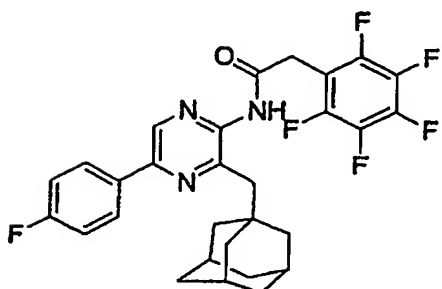
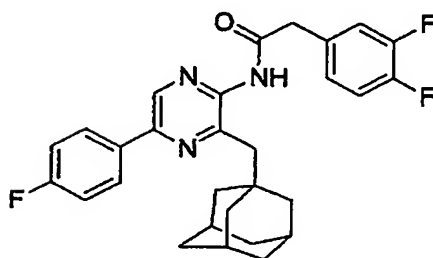
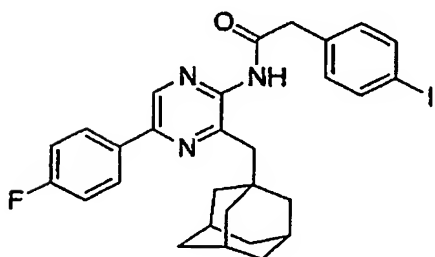
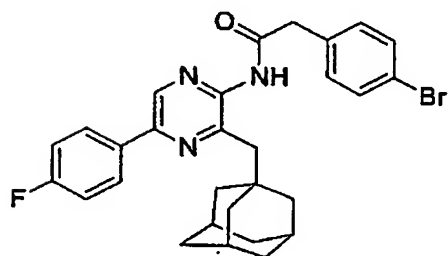
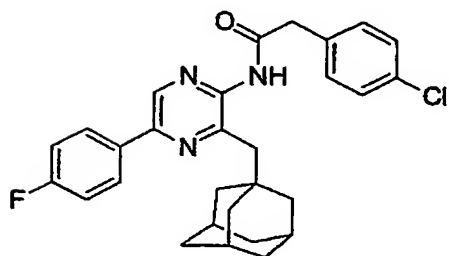
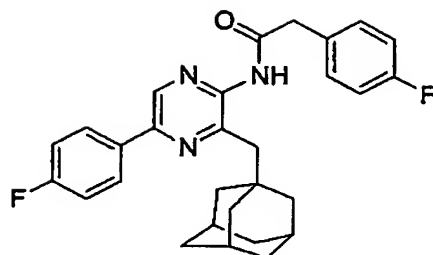
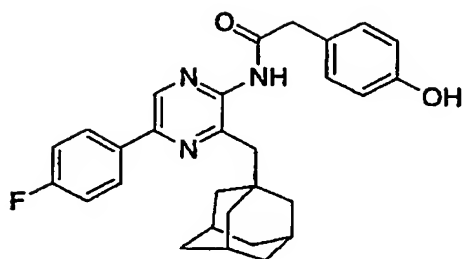
【0211】

【化112】



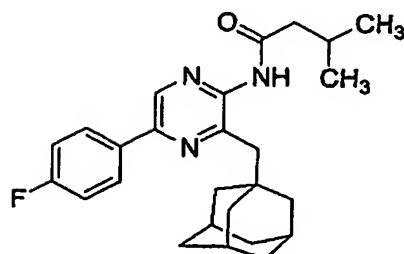
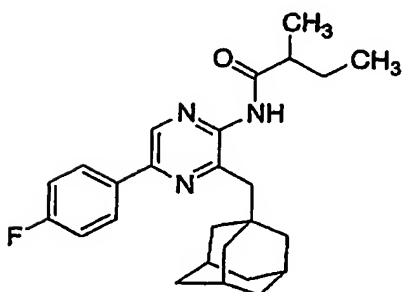
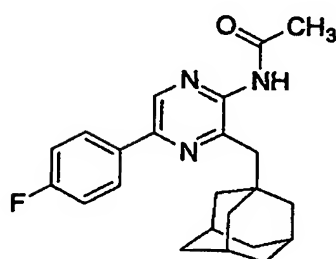
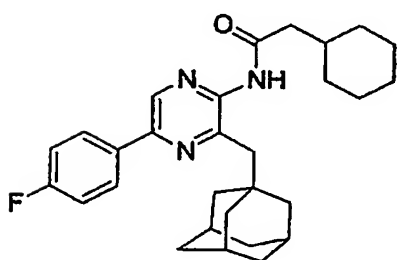
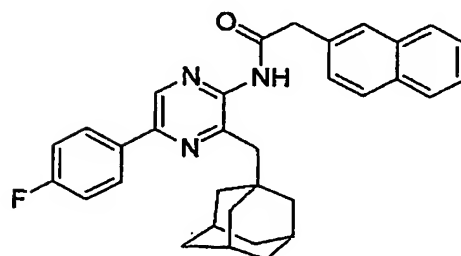
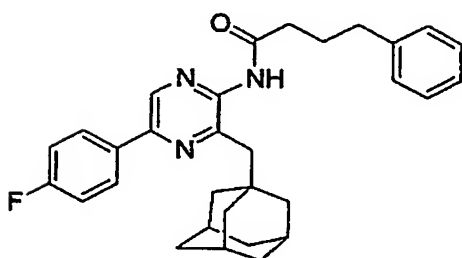
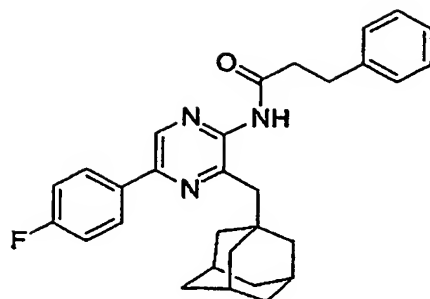
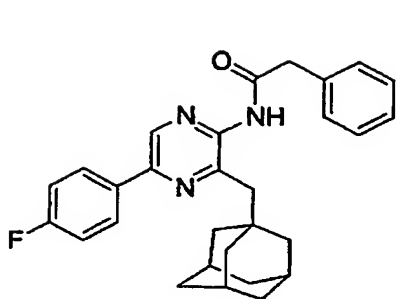
【0212】

【化113】



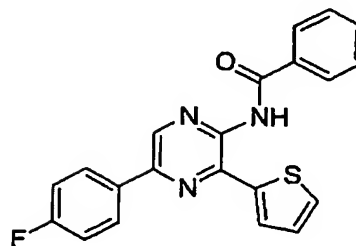
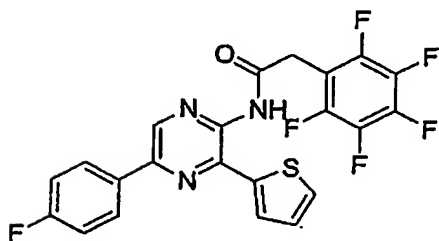
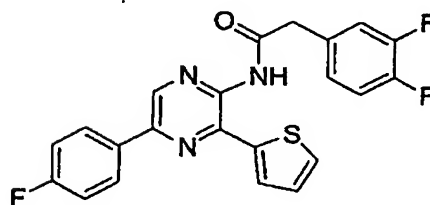
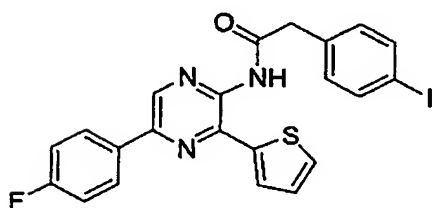
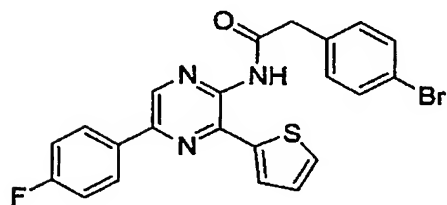
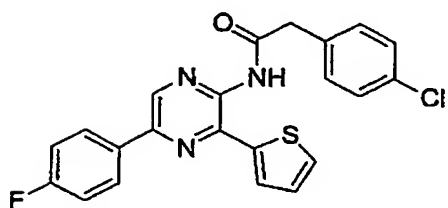
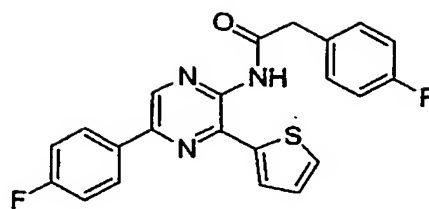
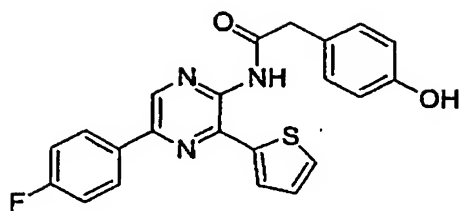
【0213】

【化114】



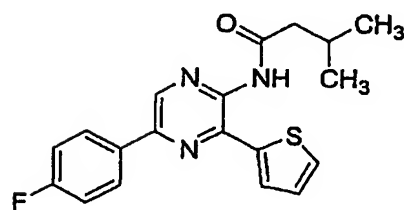
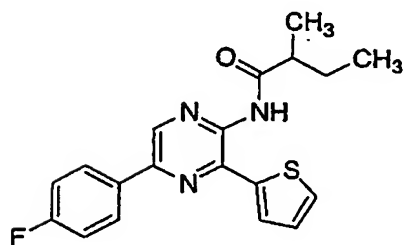
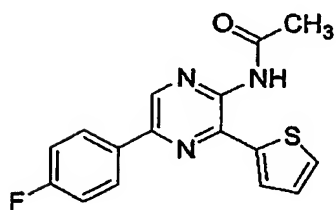
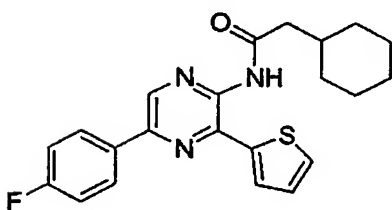
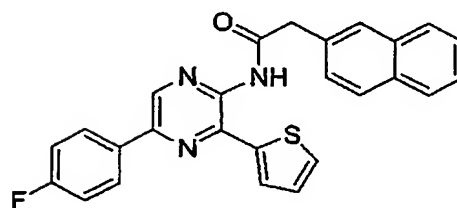
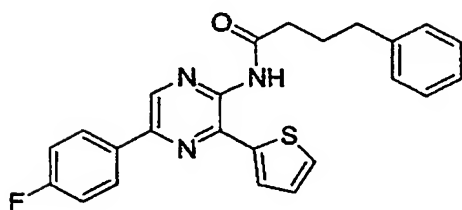
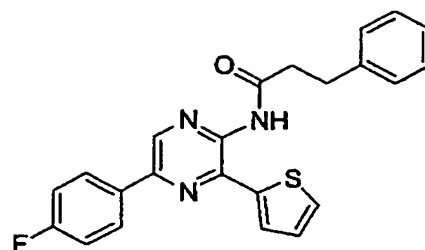
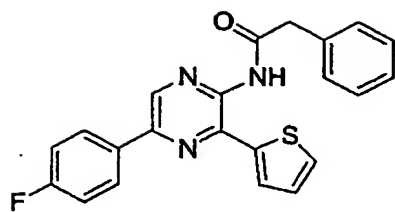
【0214】

【化115】



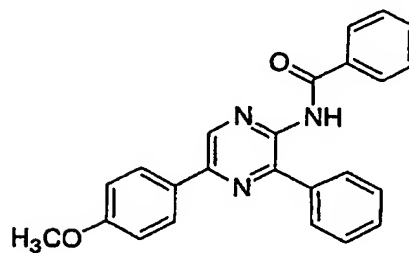
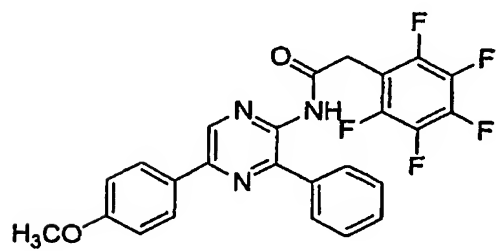
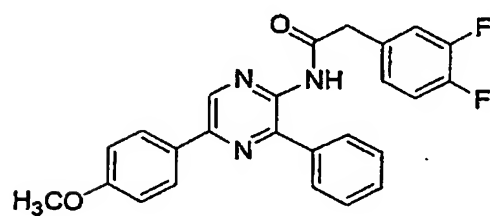
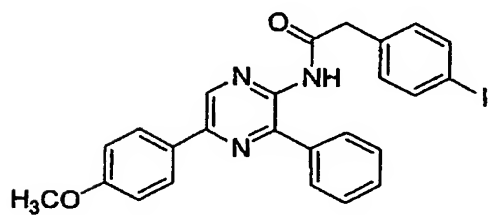
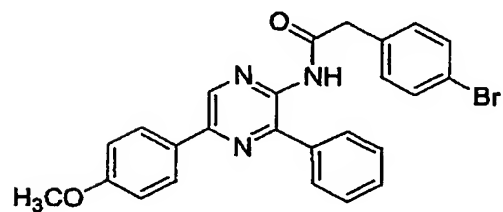
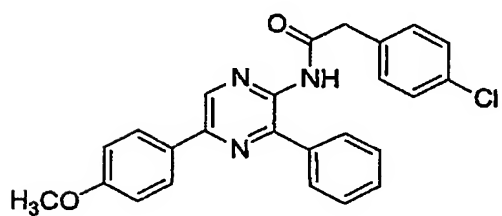
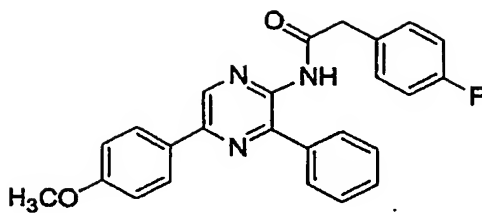
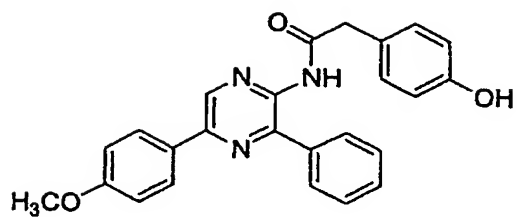
【0215】

【化116】



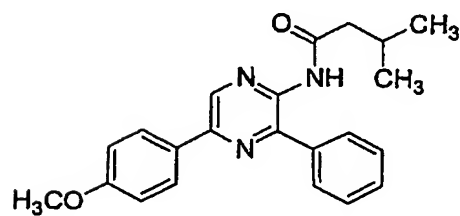
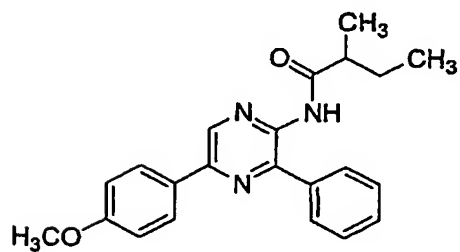
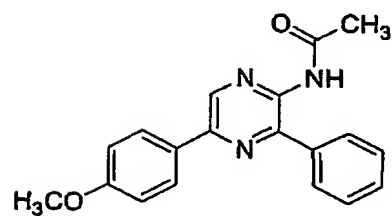
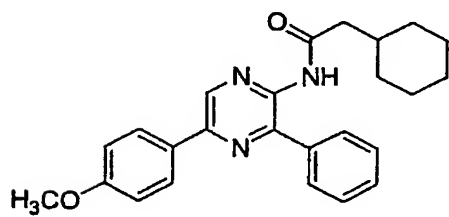
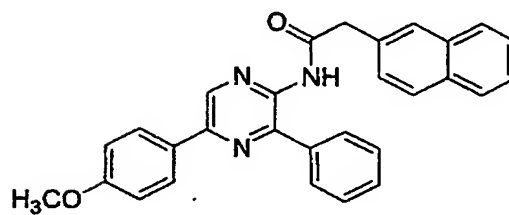
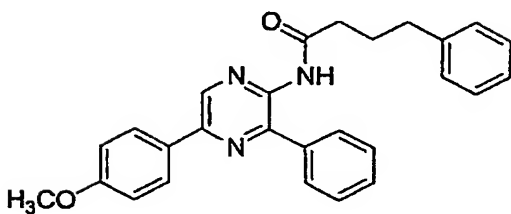
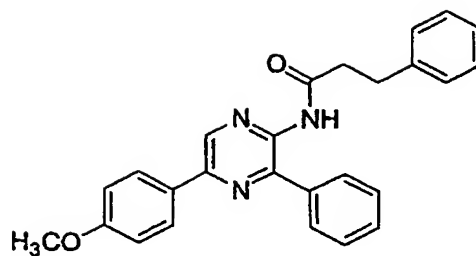
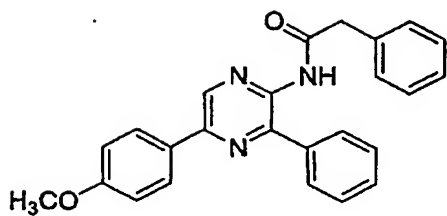
【0216】

【化117】



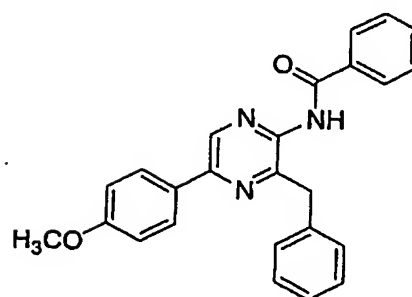
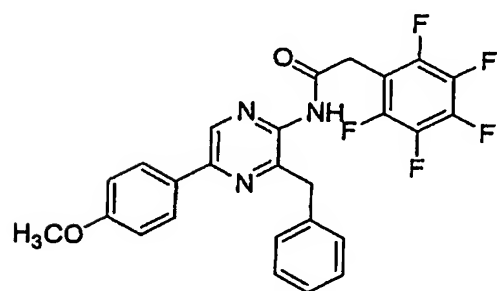
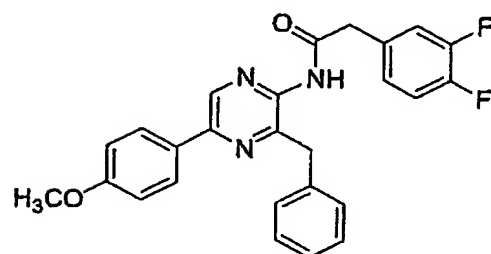
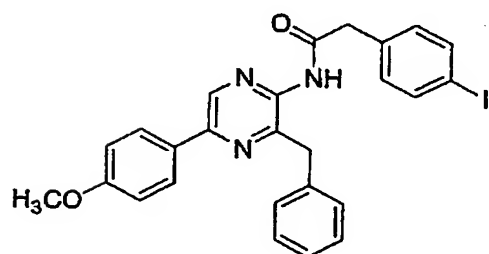
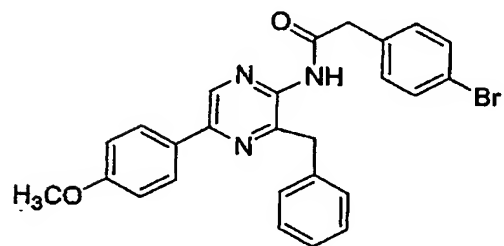
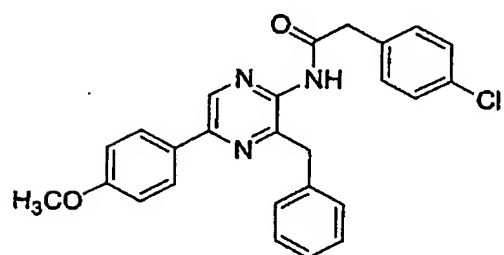
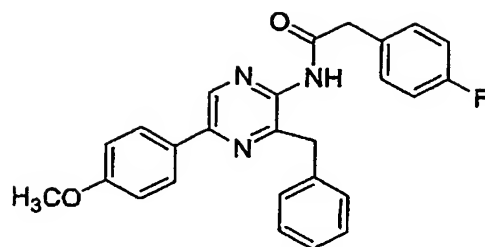
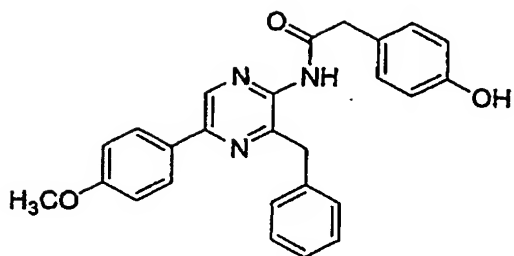
【0217】

【化118】



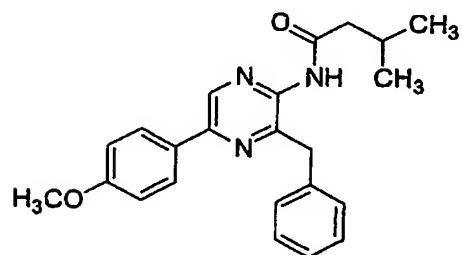
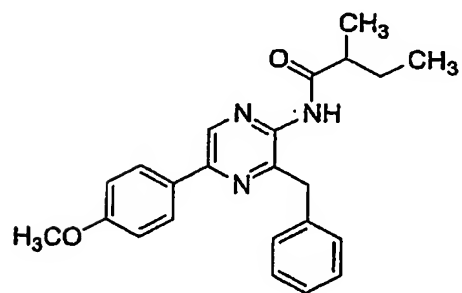
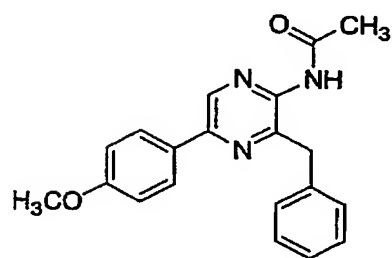
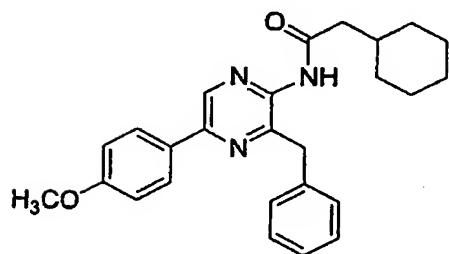
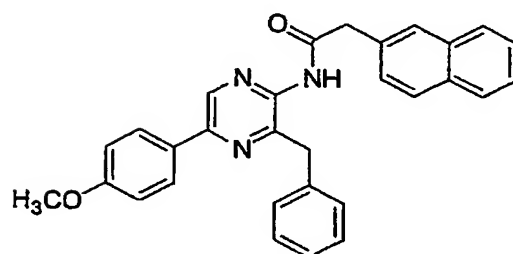
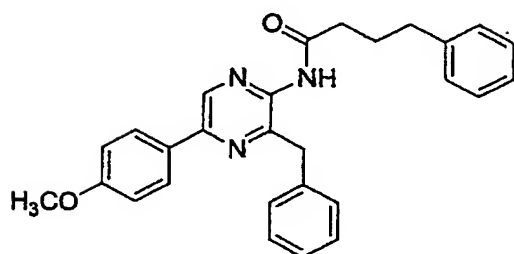
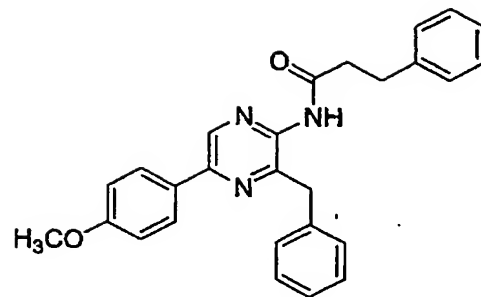
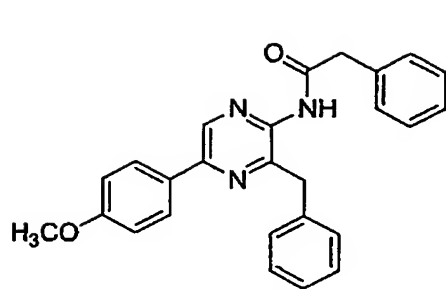
【0218】

【化119】



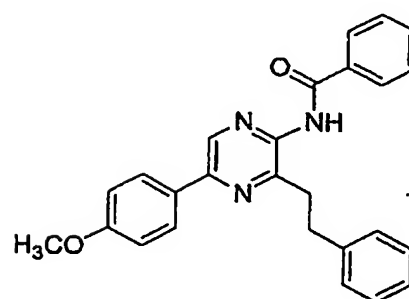
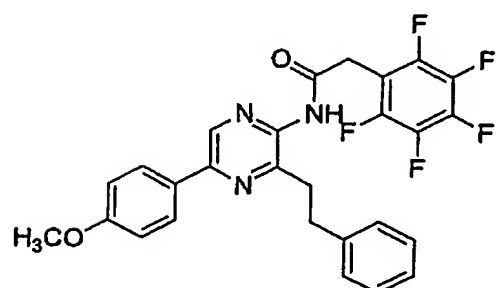
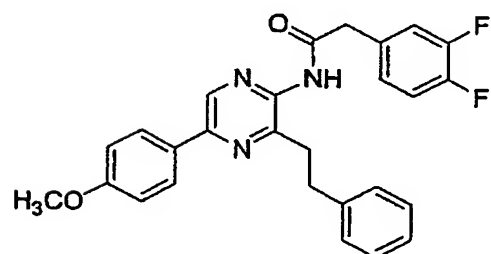
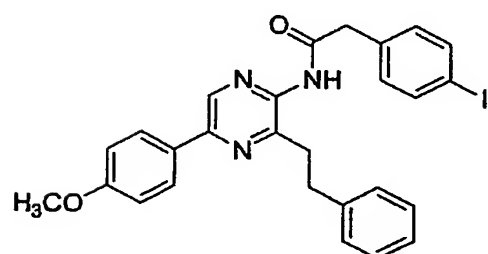
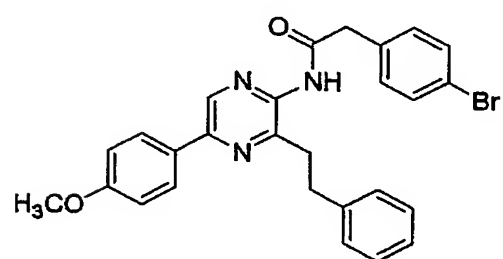
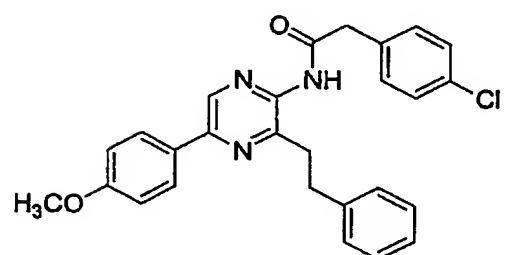
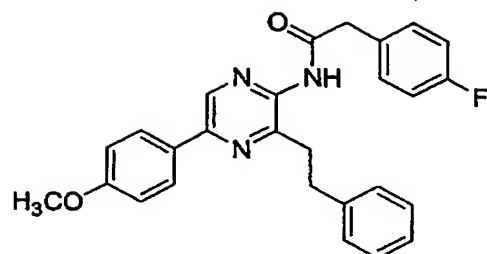
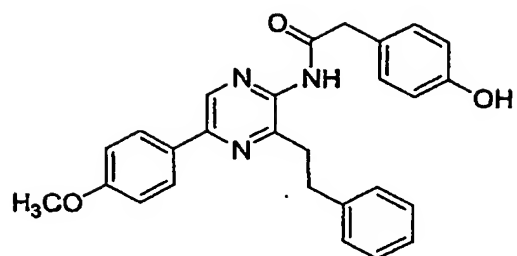
【0219】

【化 120】



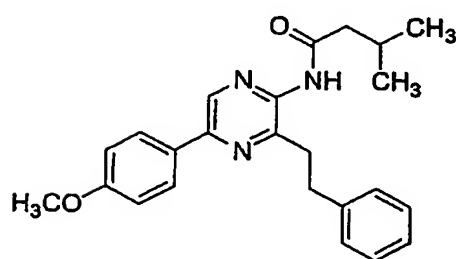
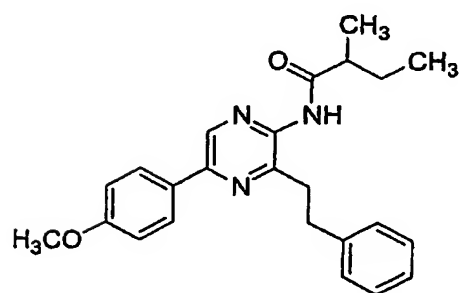
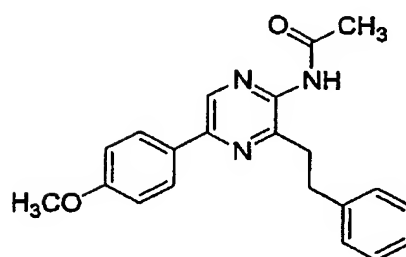
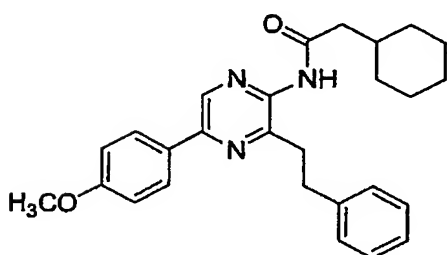
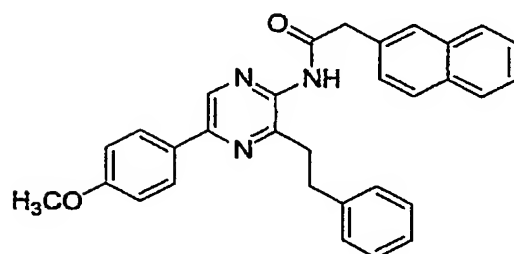
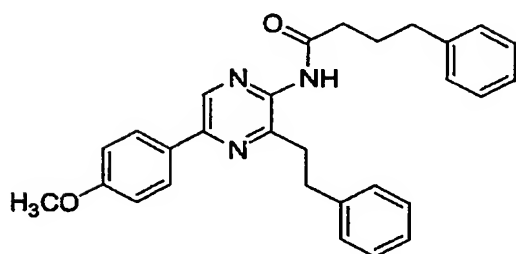
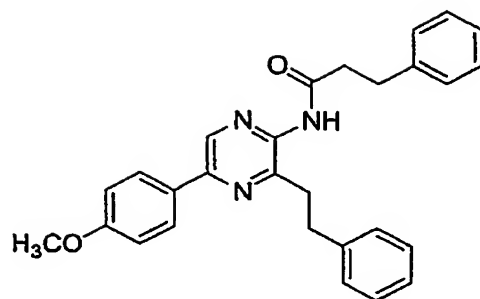
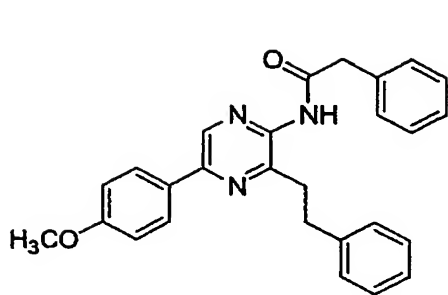
【0220】

【化121】



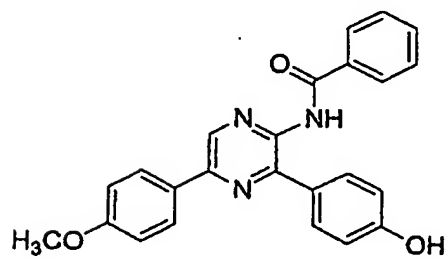
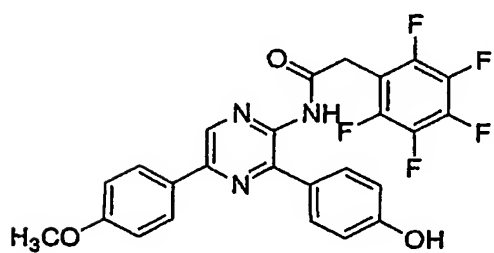
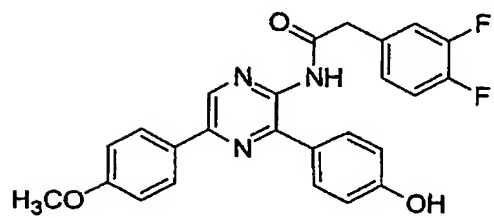
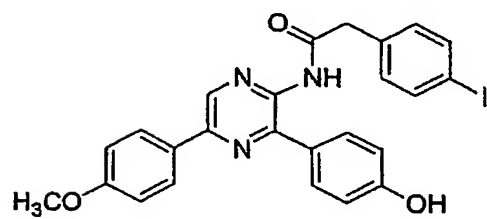
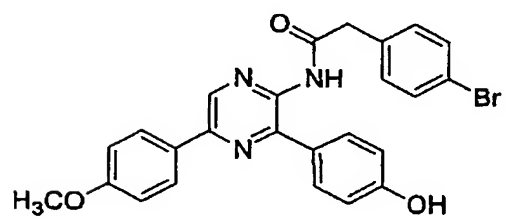
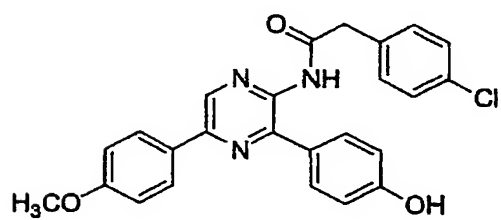
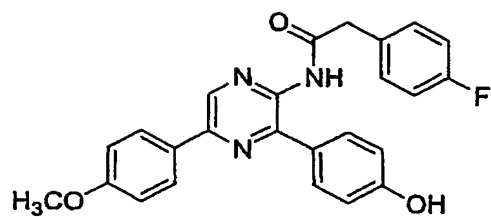
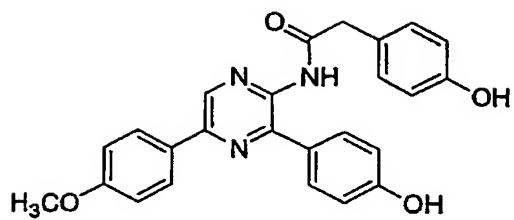
【0221】

【化122】



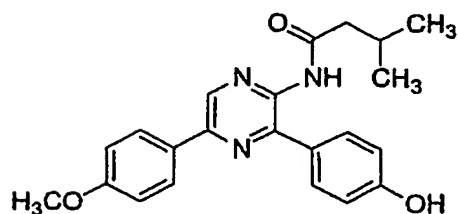
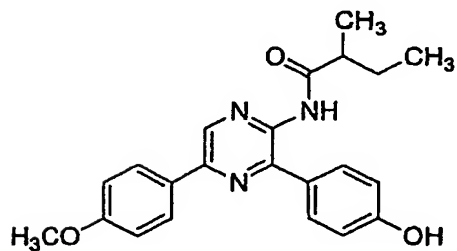
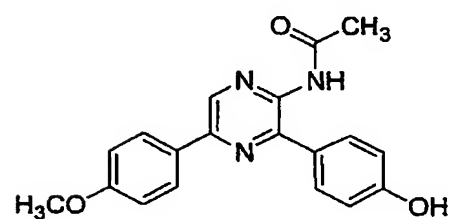
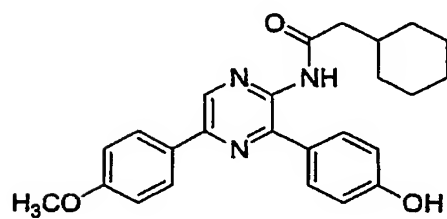
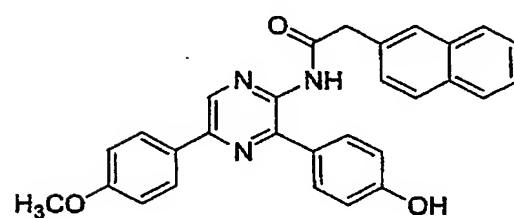
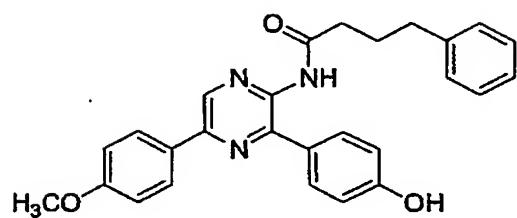
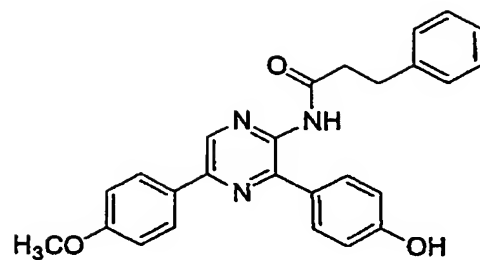
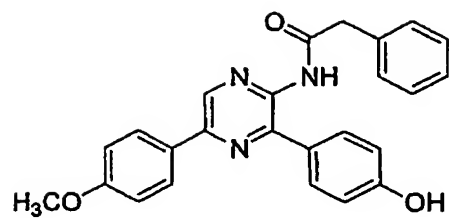
【0222】

【化 1 2 3】



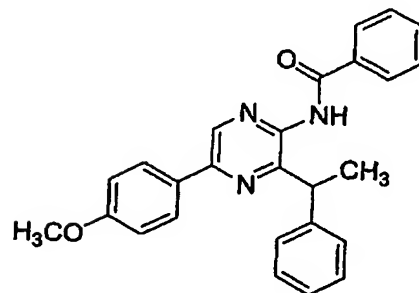
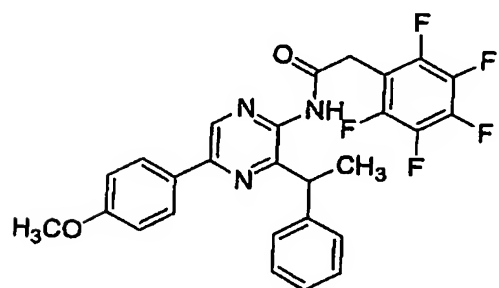
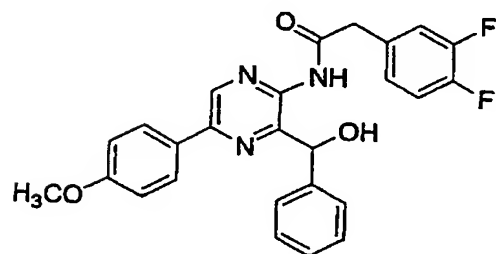
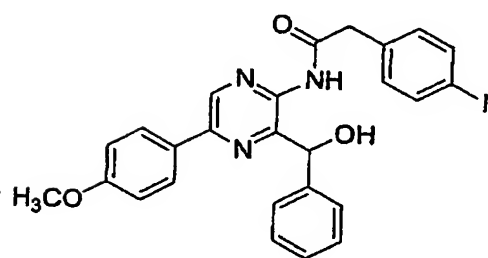
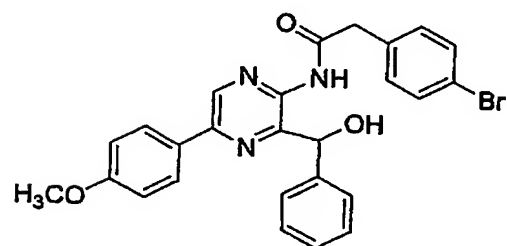
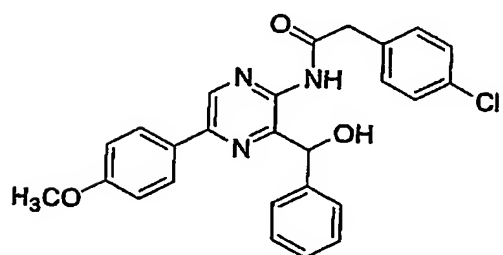
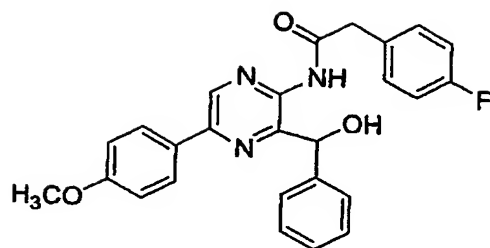
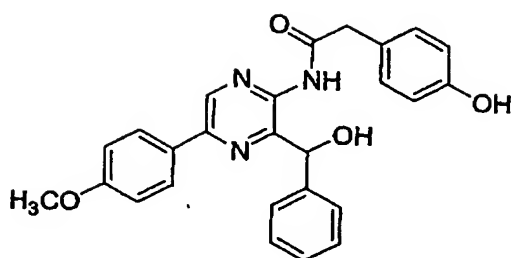
【 0 2 2 3】

【化 1 2 4】



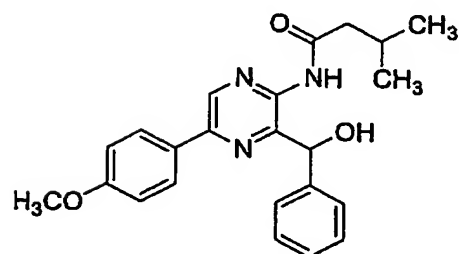
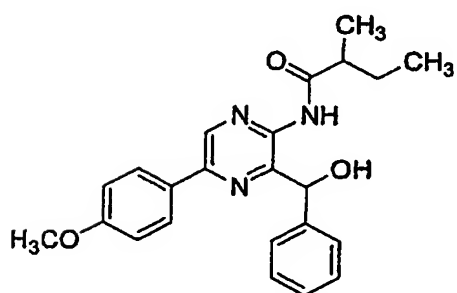
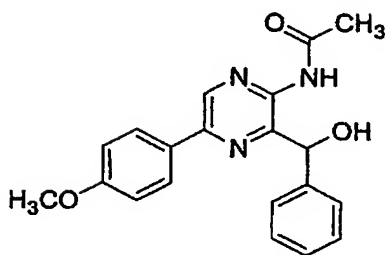
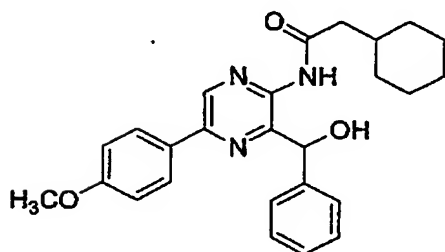
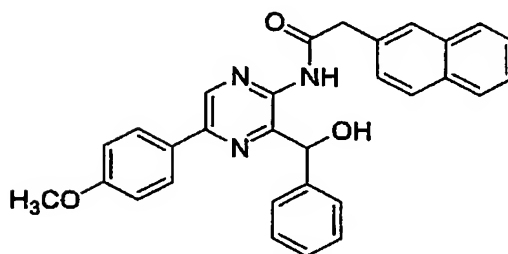
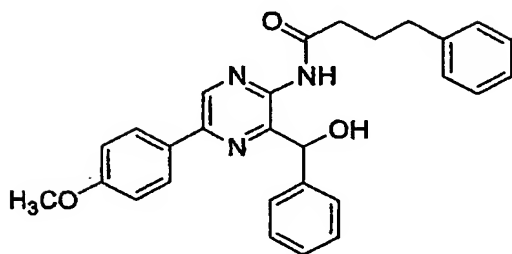
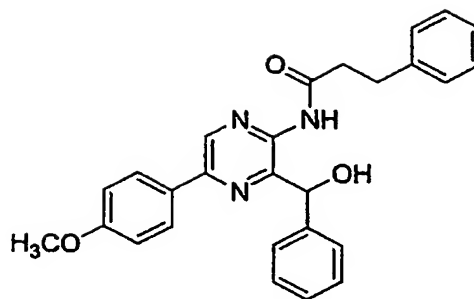
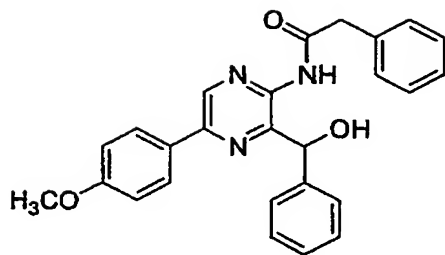
【 0 2 2 4 】

【化 125】



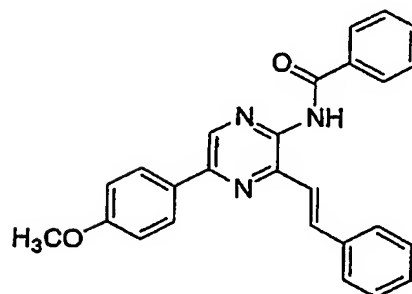
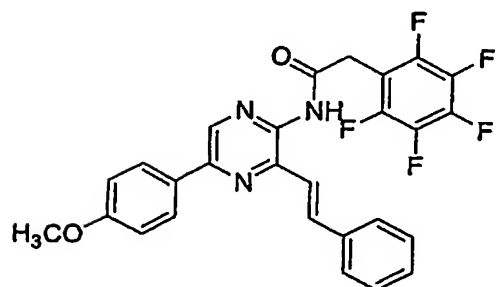
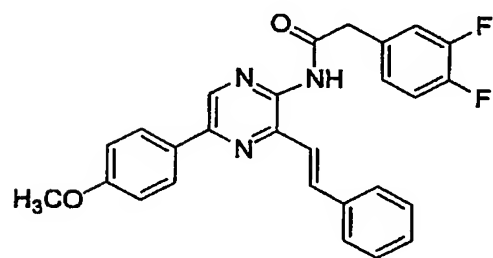
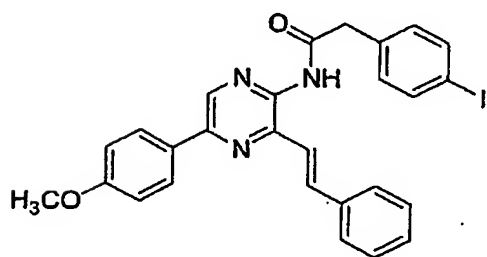
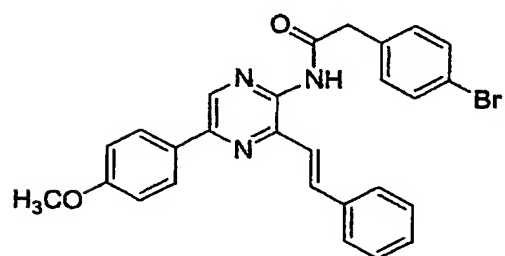
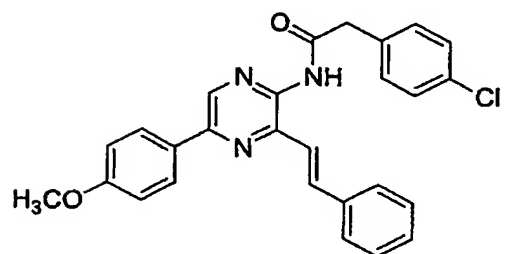
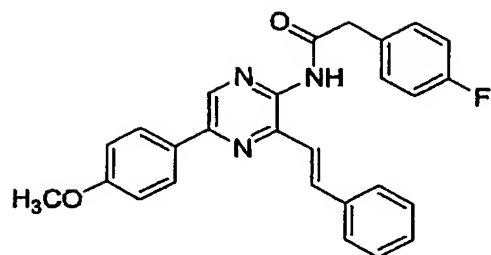
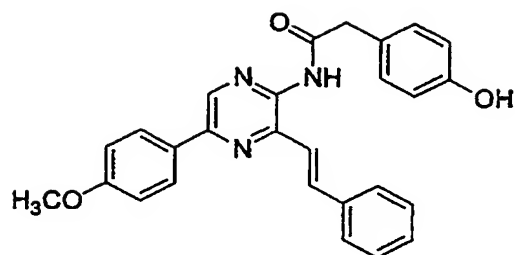
【0225】

【化 126】



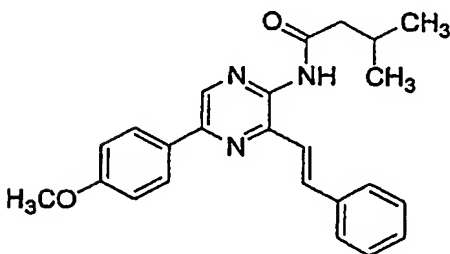
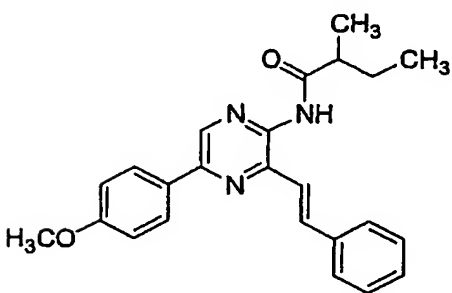
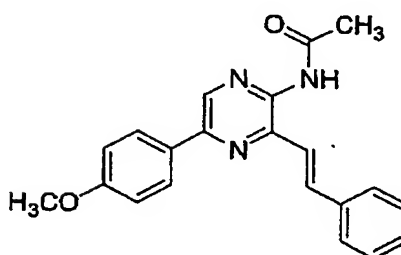
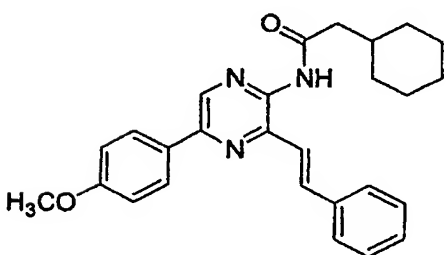
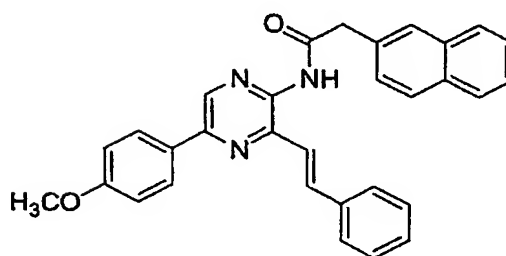
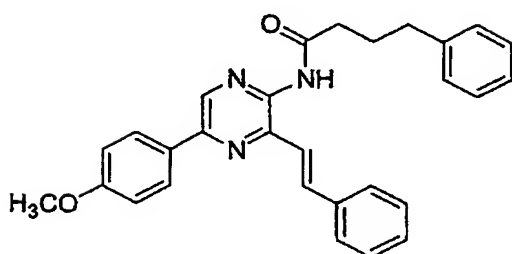
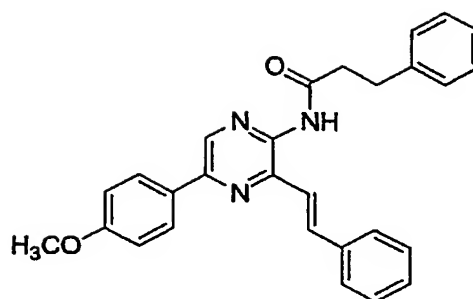
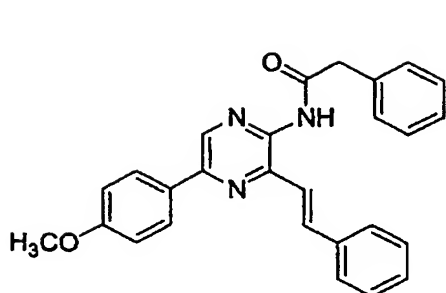
【0226】

【化127】



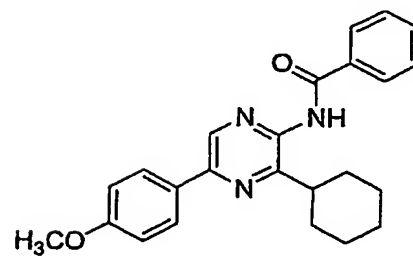
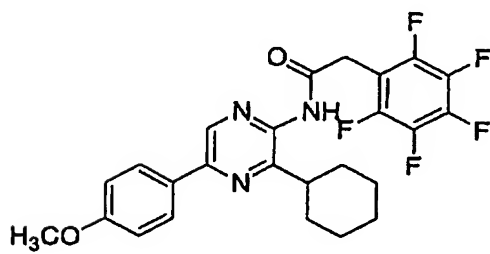
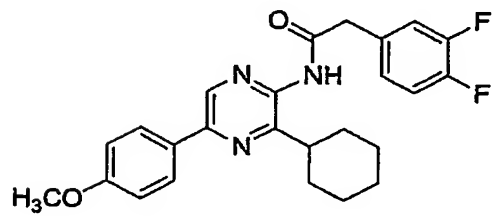
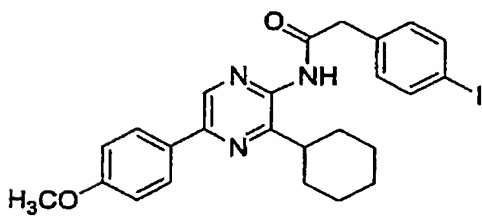
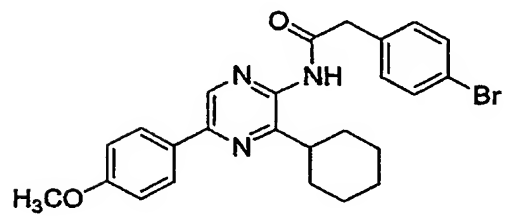
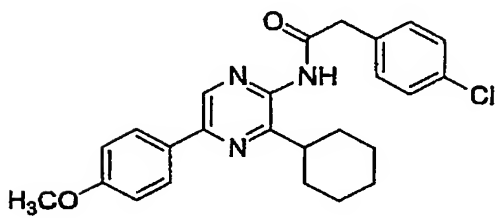
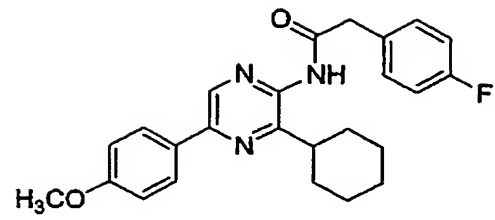
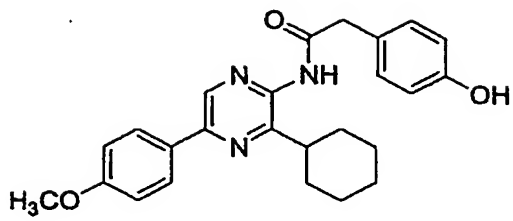
【0227】

【化128】



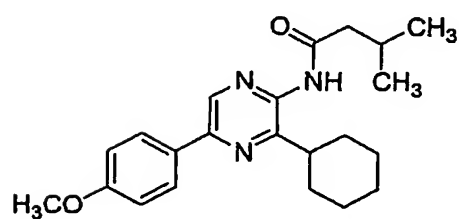
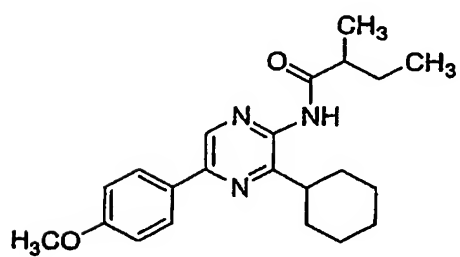
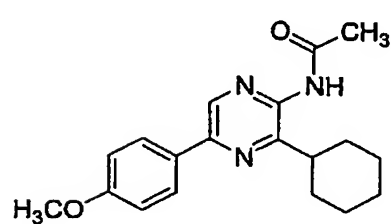
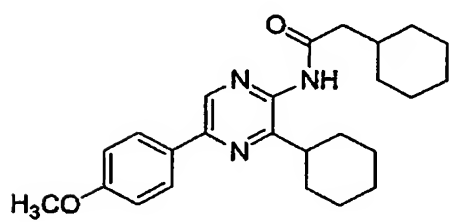
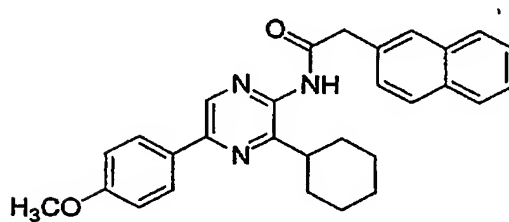
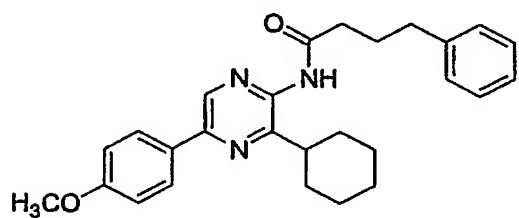
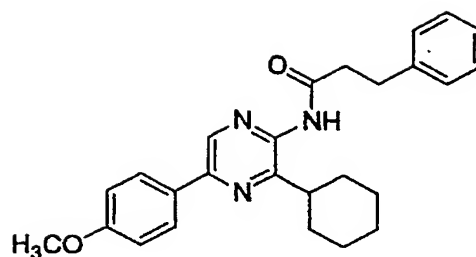
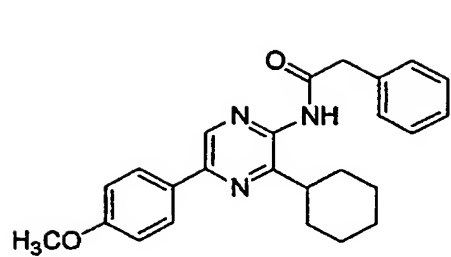
【0228】

【化129】



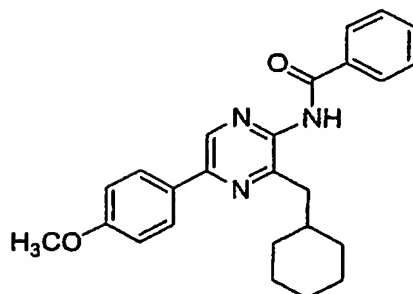
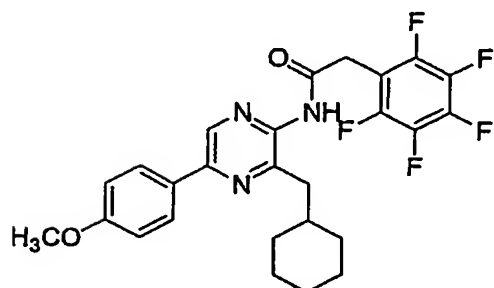
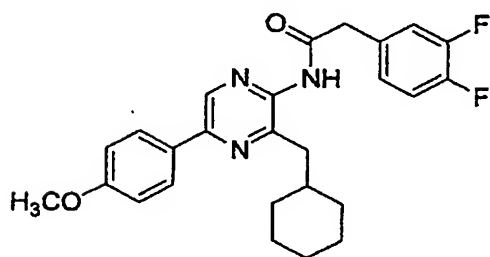
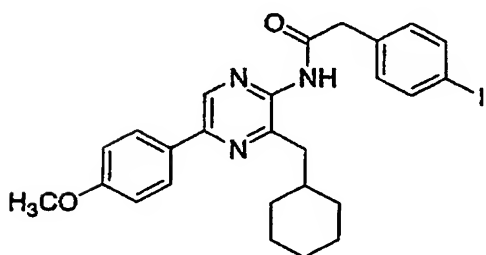
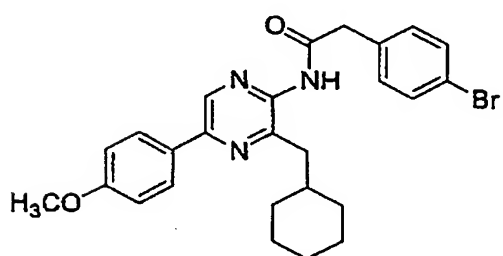
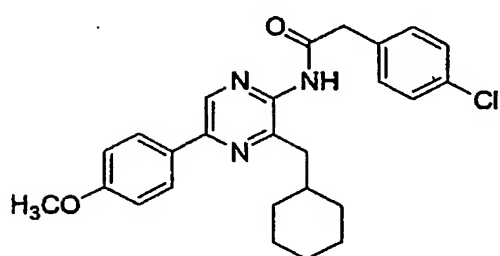
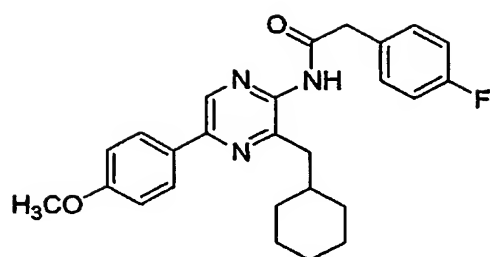
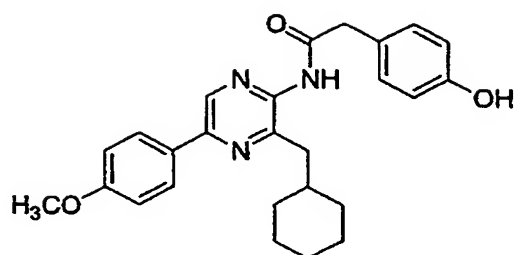
【0229】

【化130】



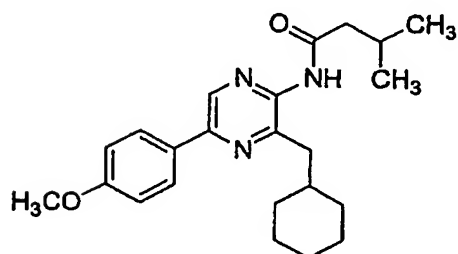
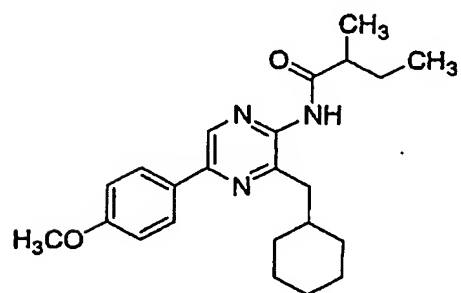
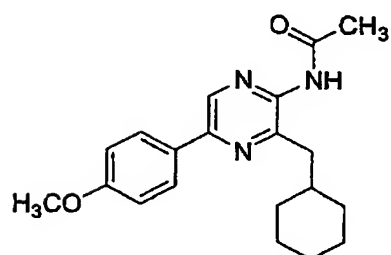
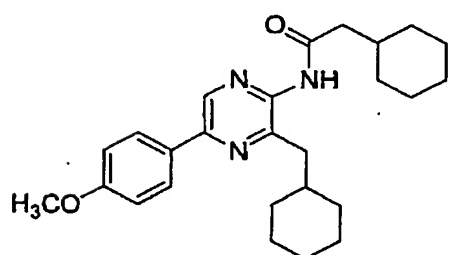
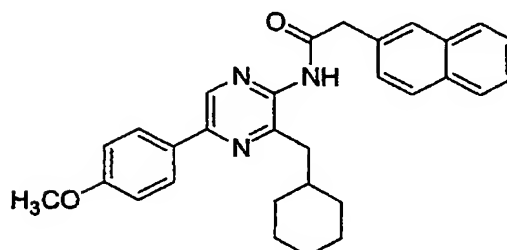
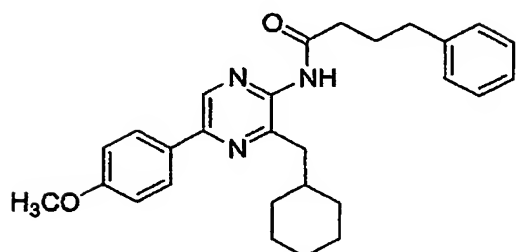
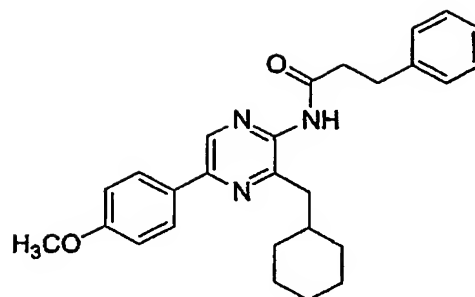
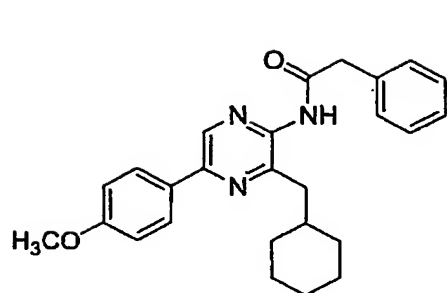
【0230】

【化131】



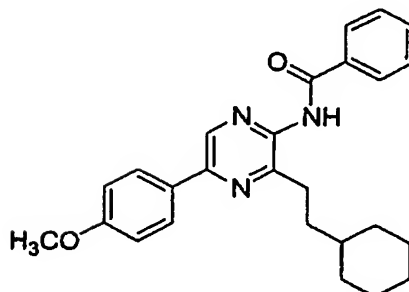
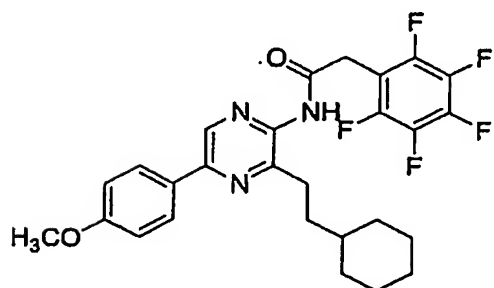
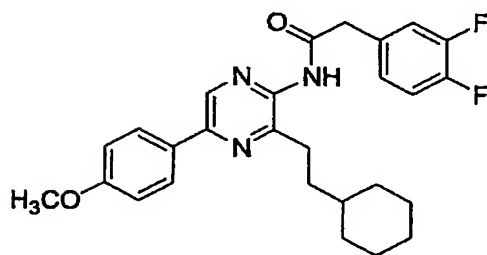
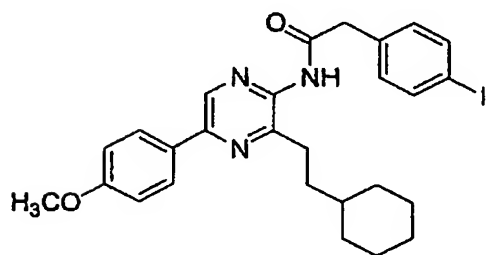
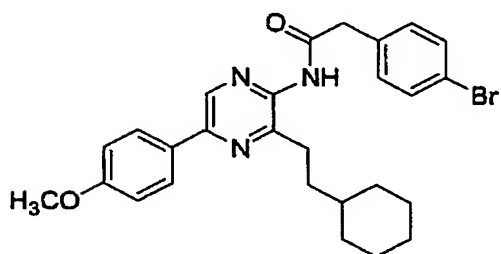
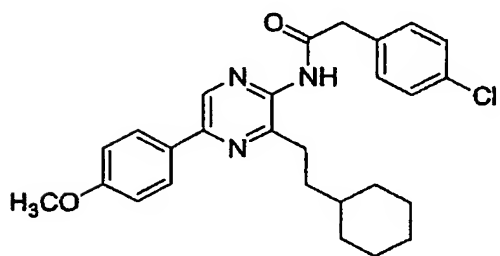
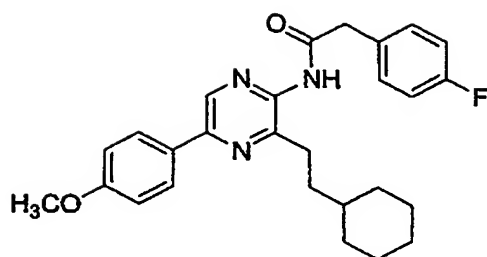
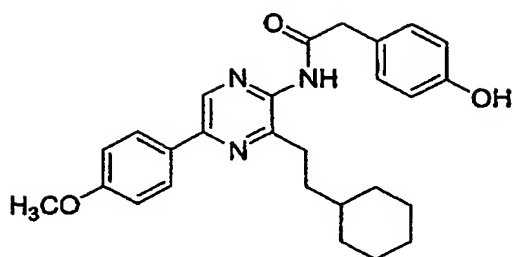
【0231】

【化132】



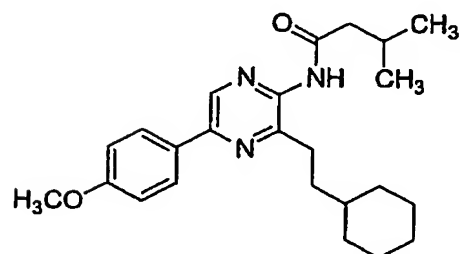
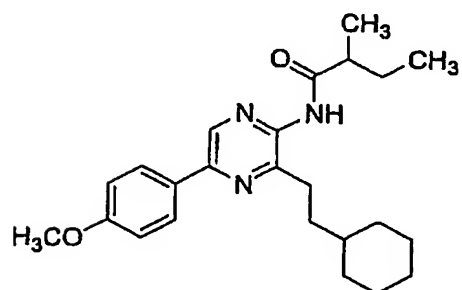
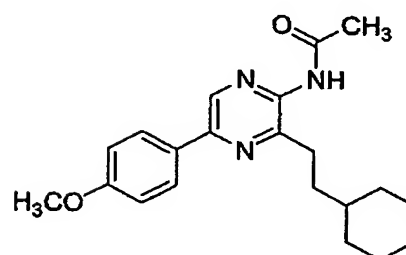
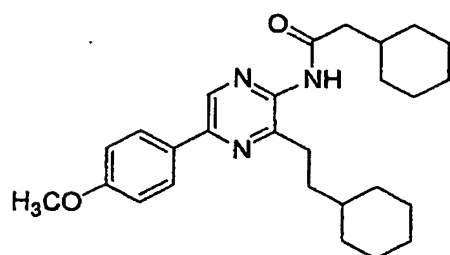
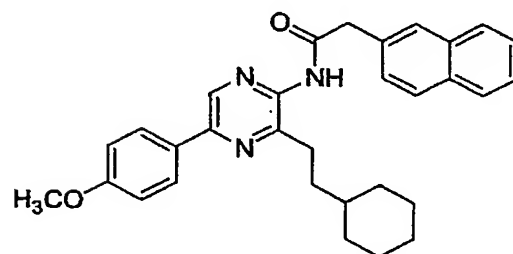
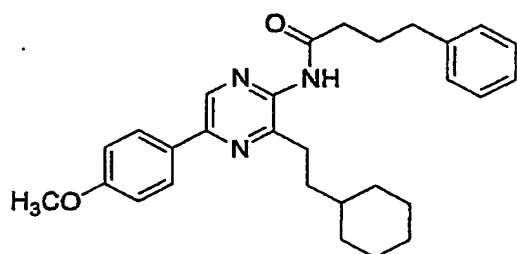
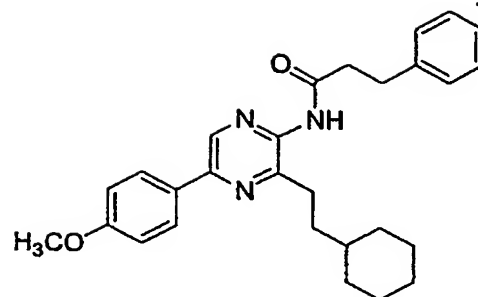
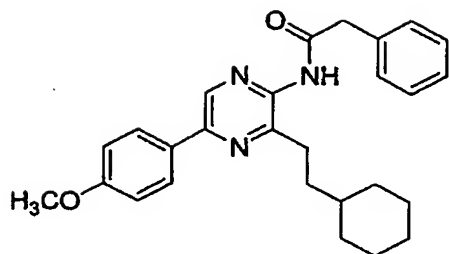
【0232】

【化133】



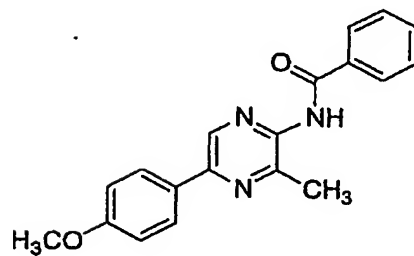
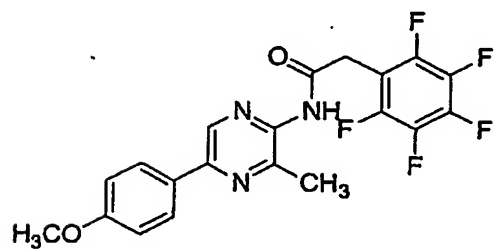
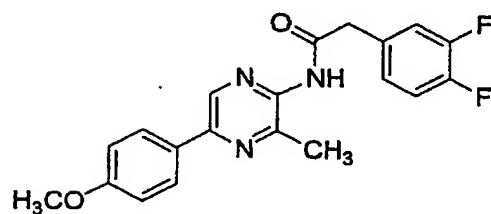
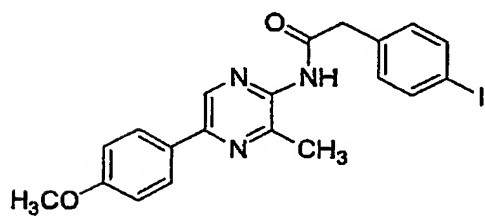
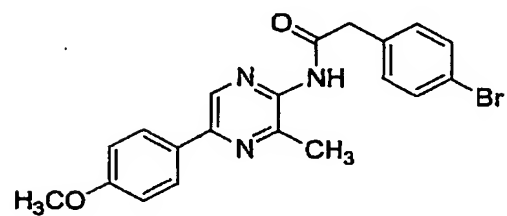
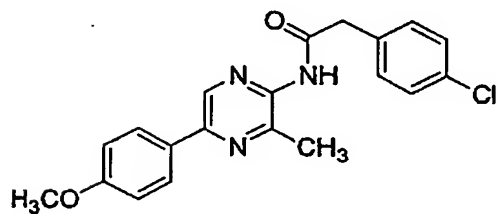
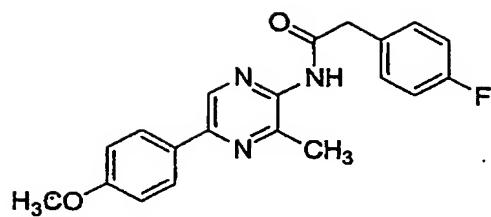
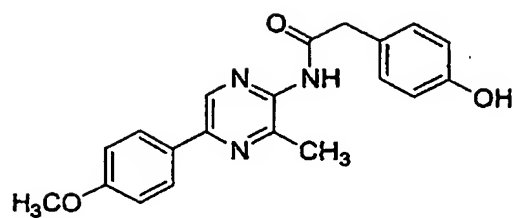
【0233】

【化134】



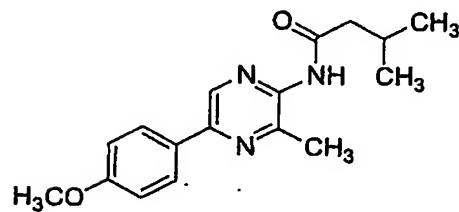
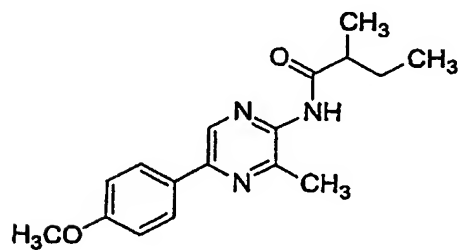
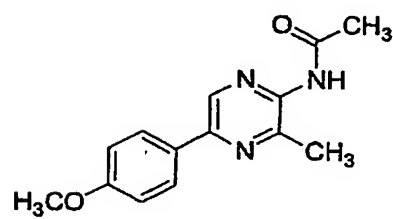
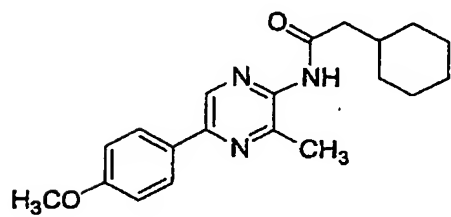
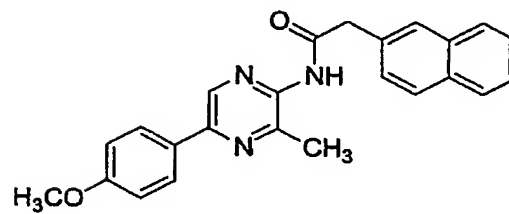
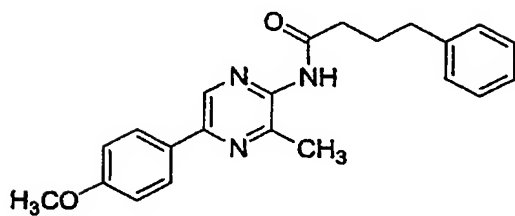
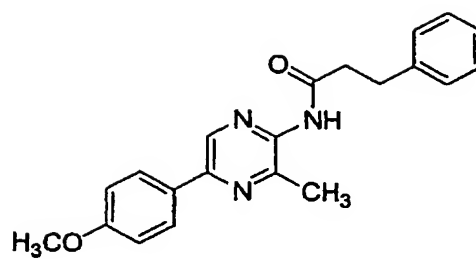
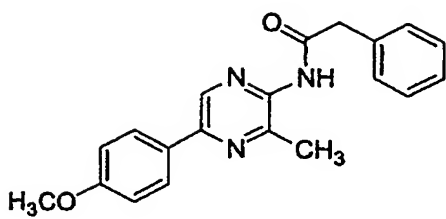
【0234】

【化135】



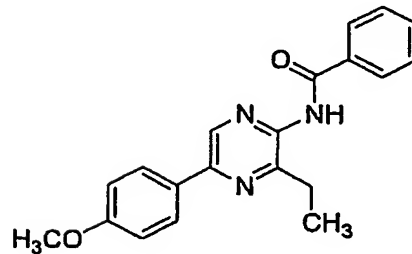
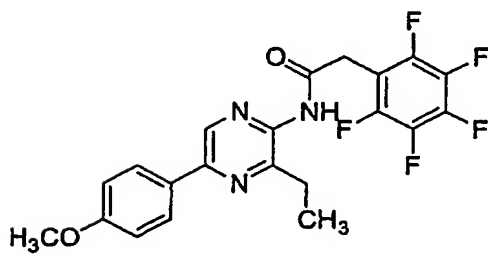
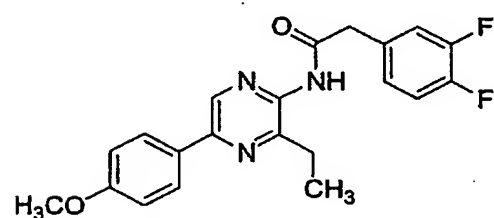
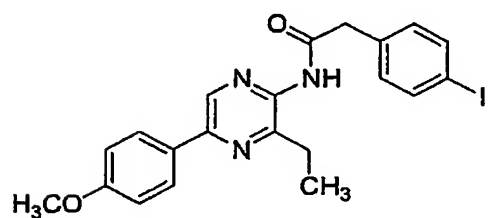
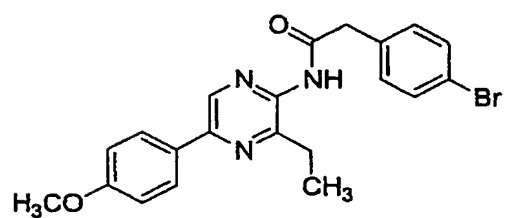
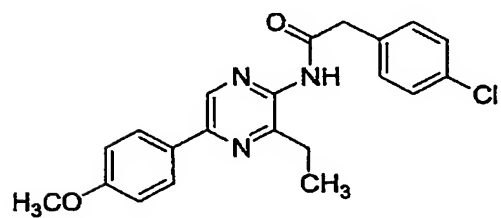
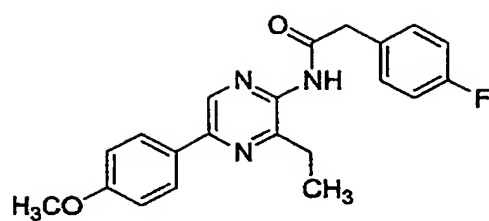
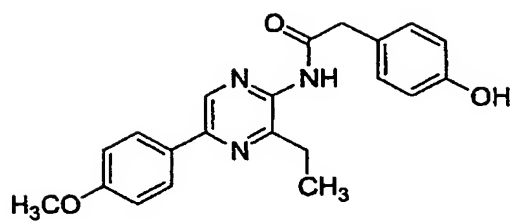
【0235】

【化136】



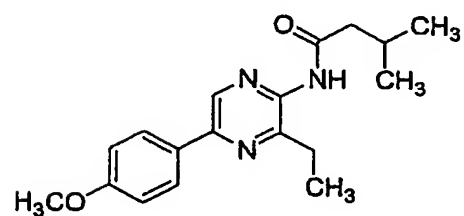
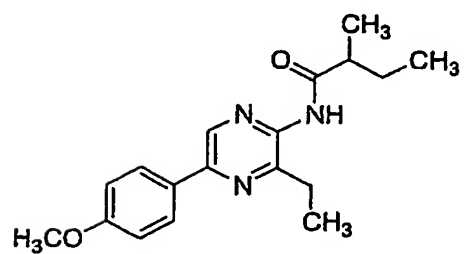
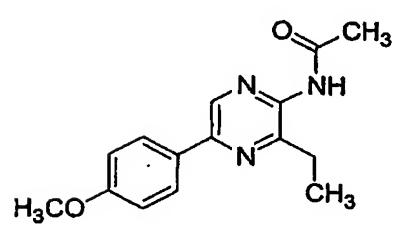
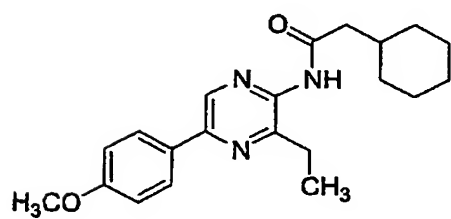
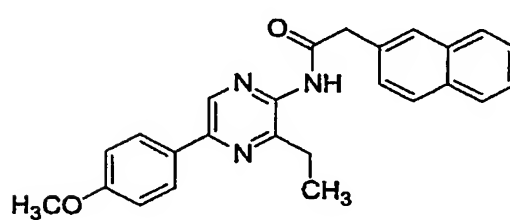
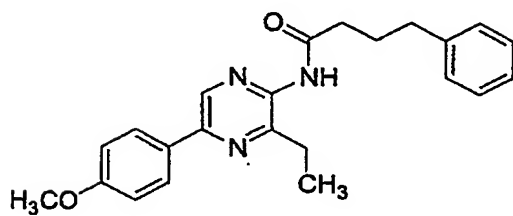
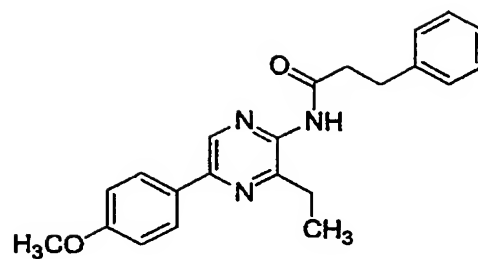
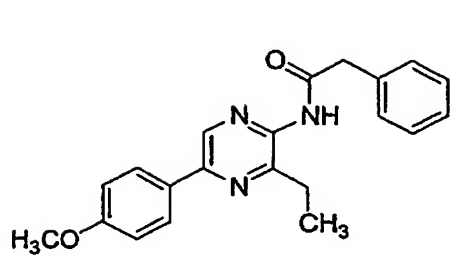
【0236】

【化137】



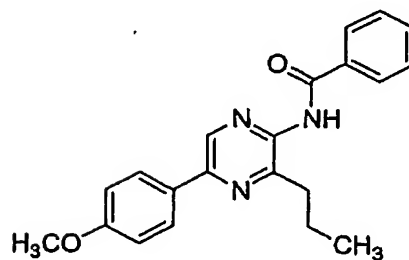
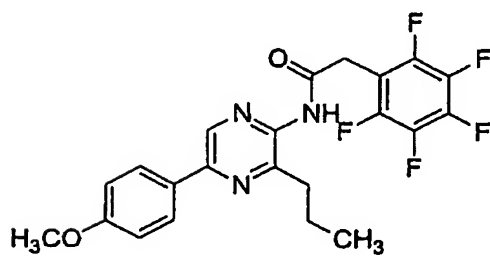
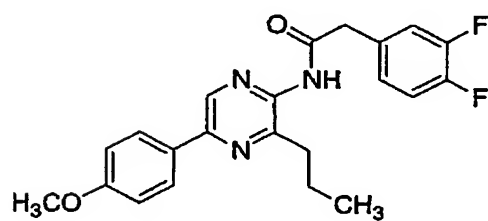
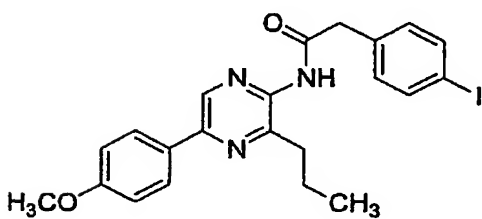
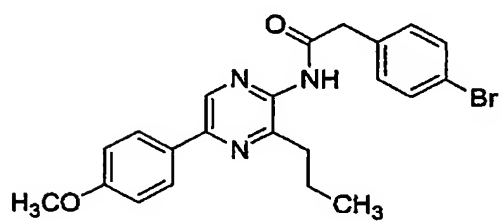
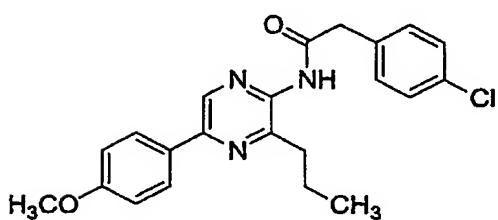
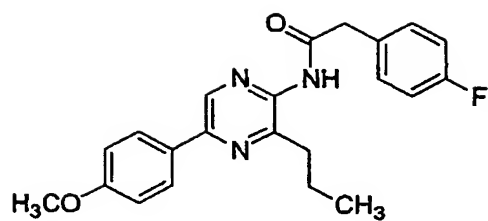
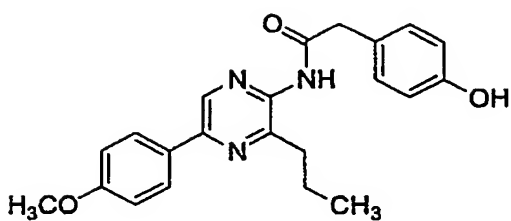
【0237】

【化138】



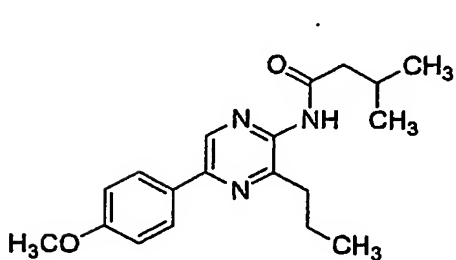
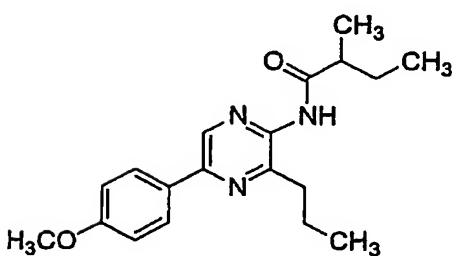
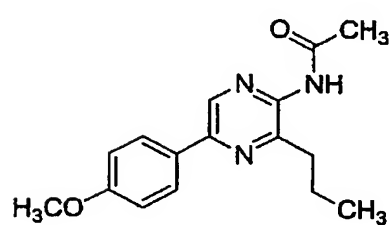
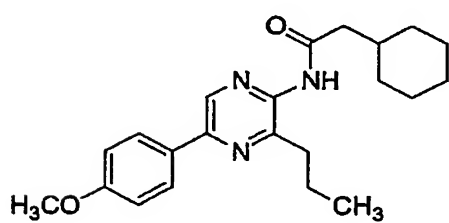
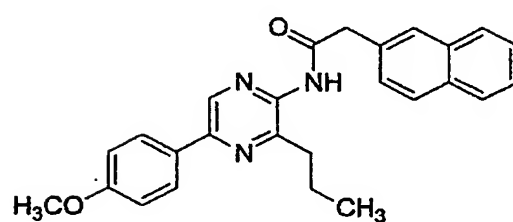
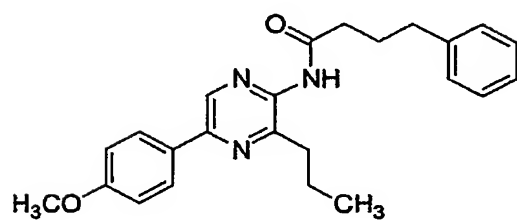
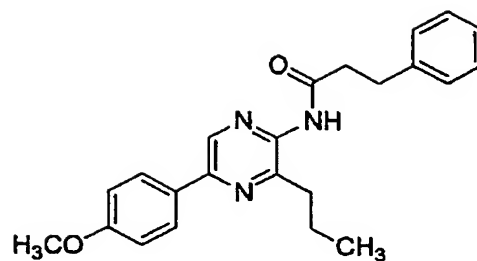
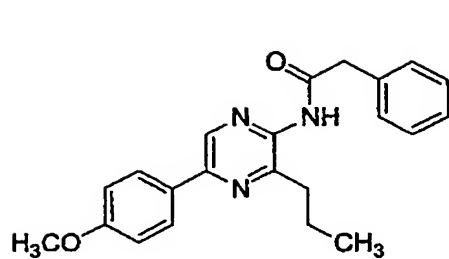
【0238】

【化139】



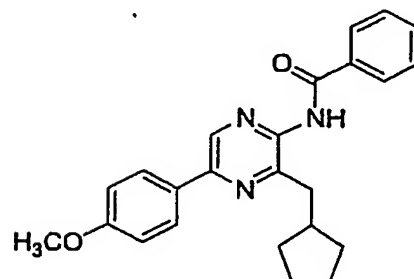
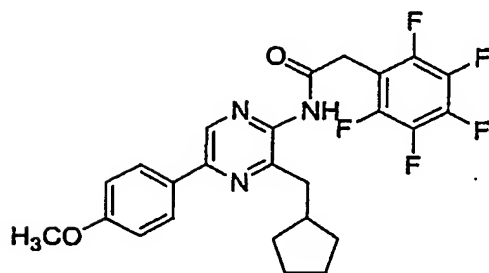
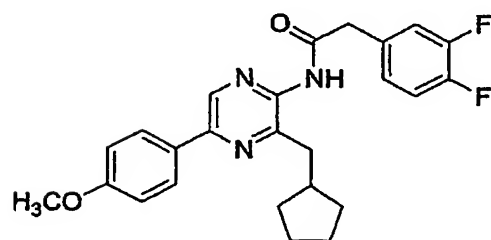
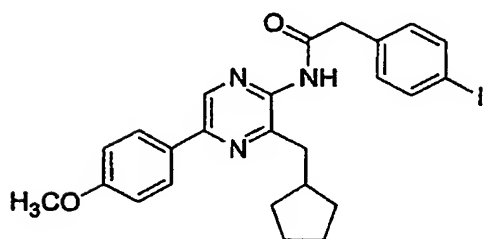
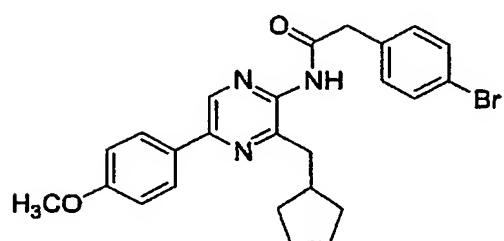
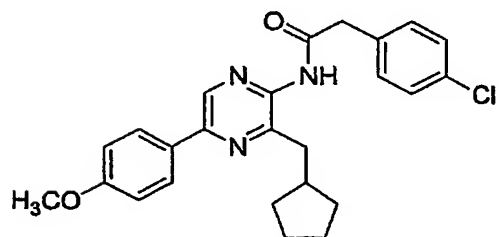
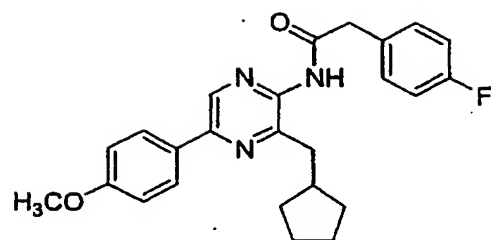
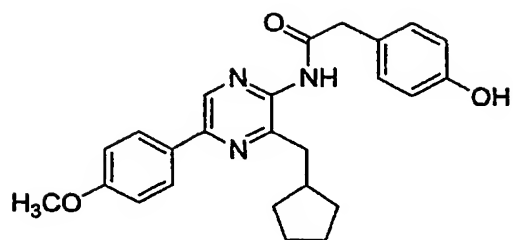
【0239】

【化140】



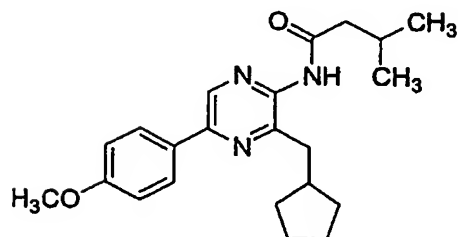
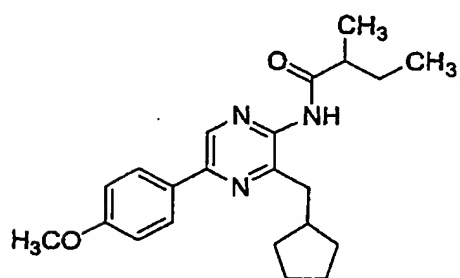
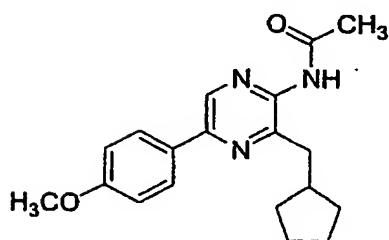
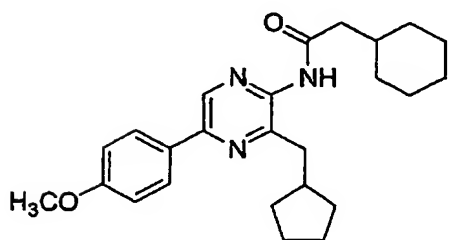
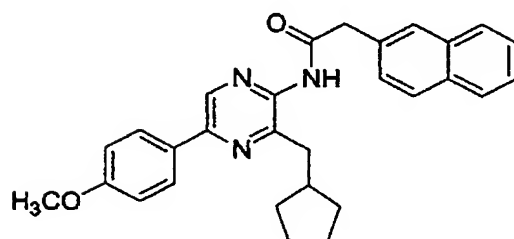
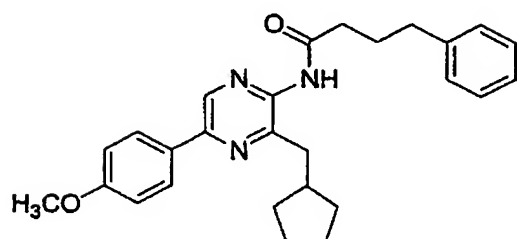
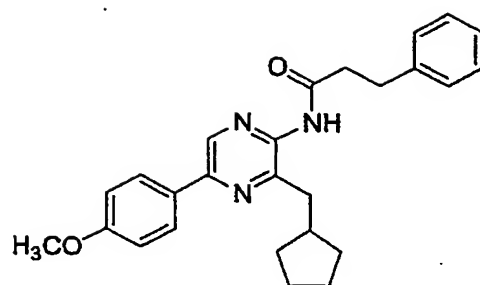
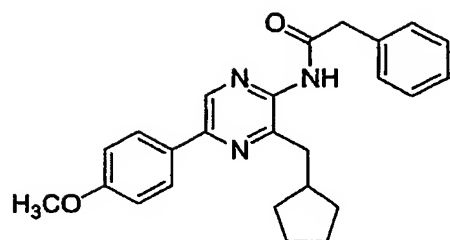
【0240】

【化141】



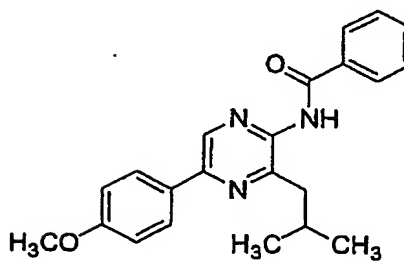
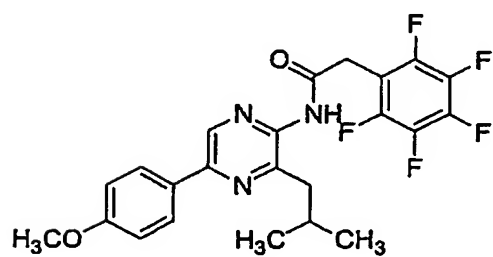
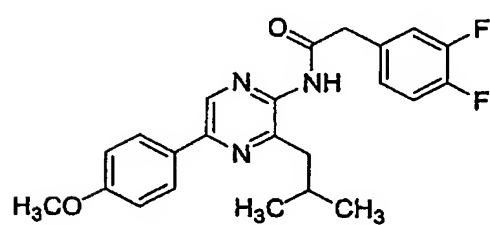
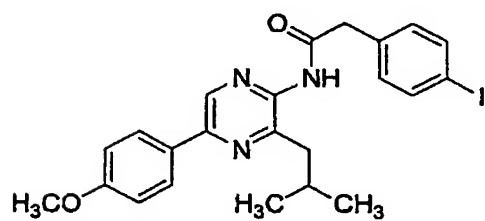
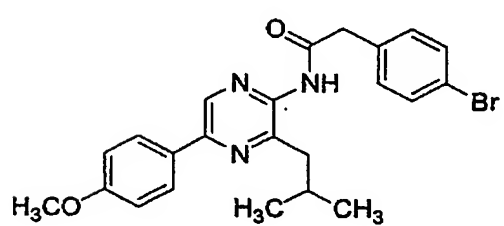
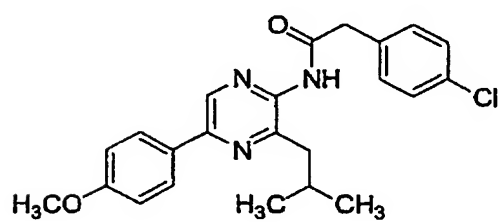
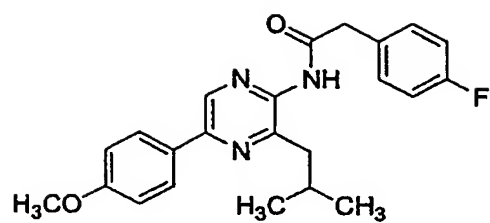
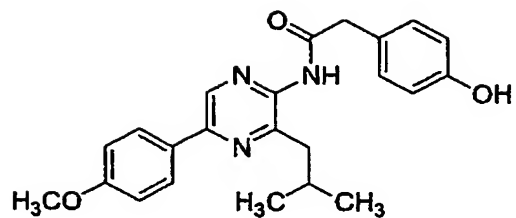
【0241】

【化142】



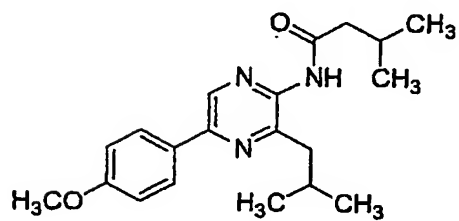
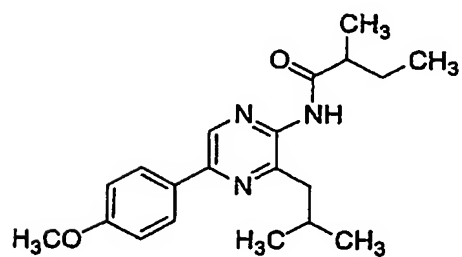
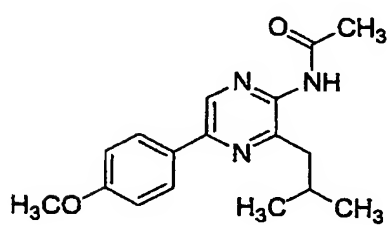
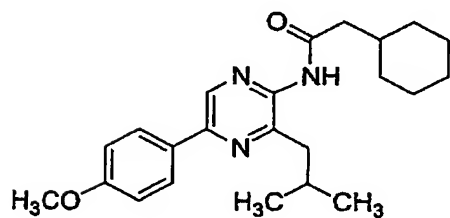
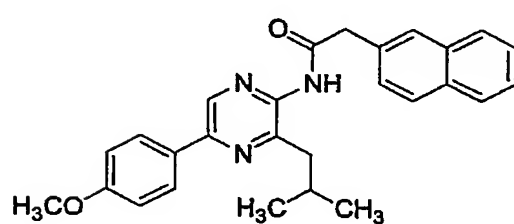
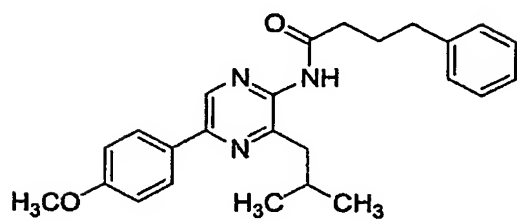
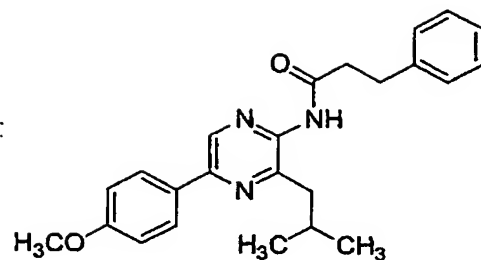
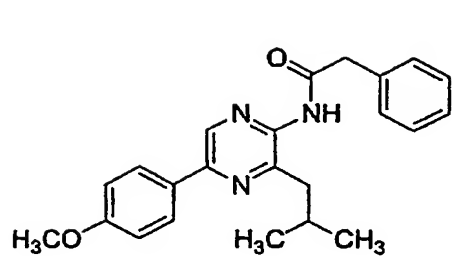
【0242】

【化 1 4 3】



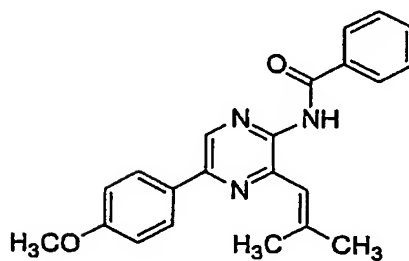
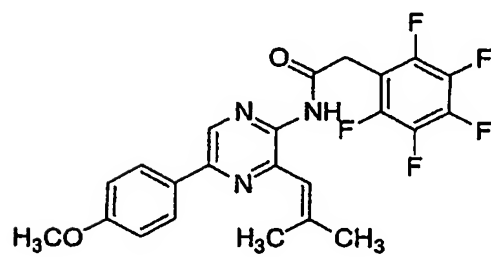
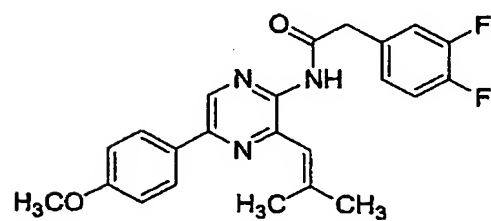
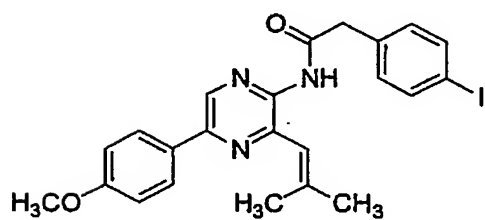
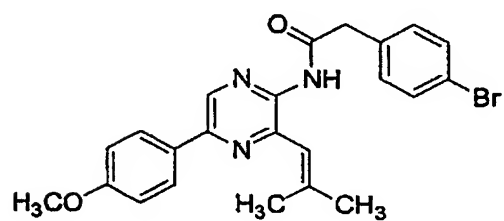
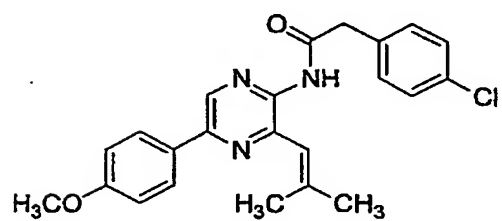
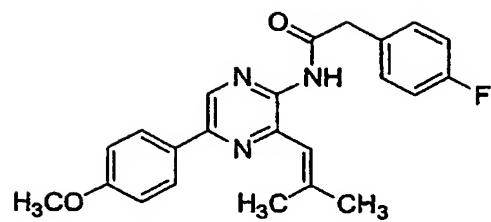
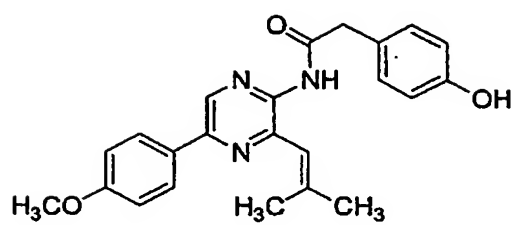
【 0 2 4 3 】

【化 1 4 4】



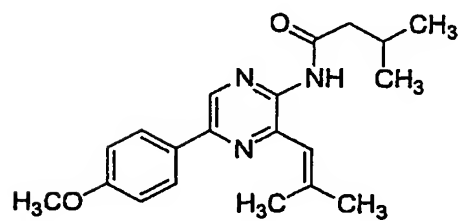
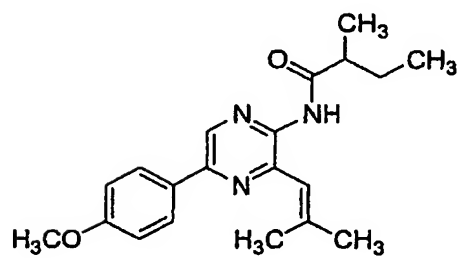
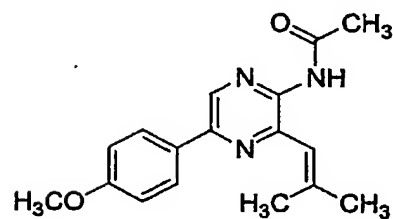
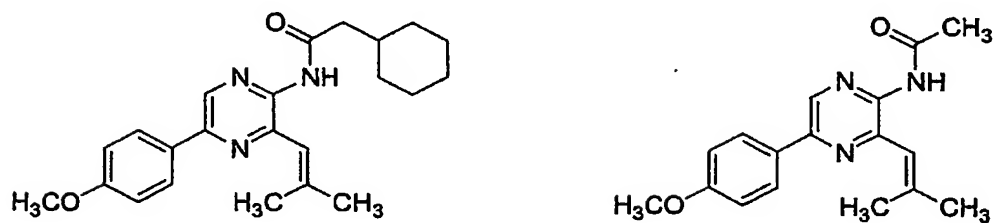
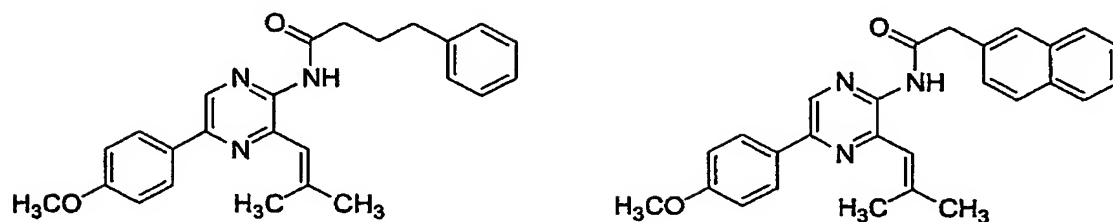
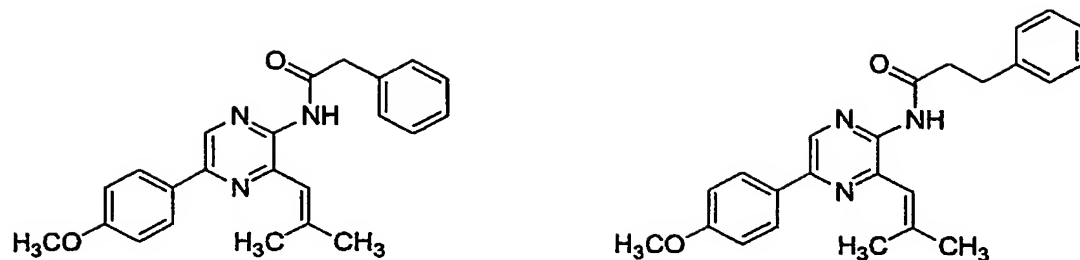
【 0 2 4 4】

【化 145】



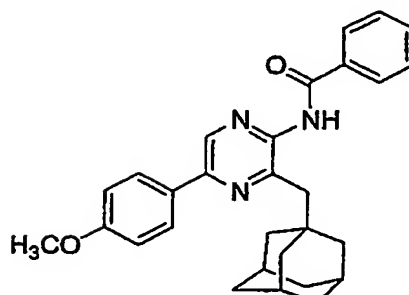
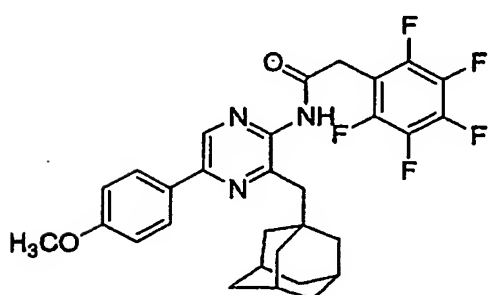
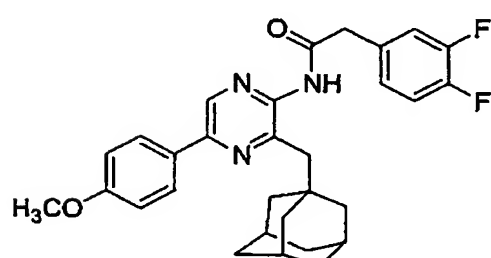
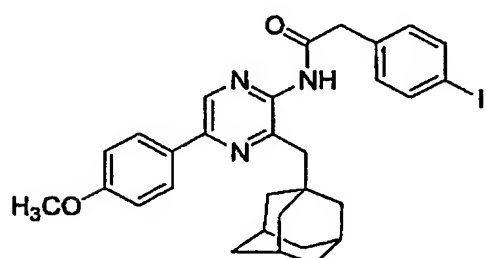
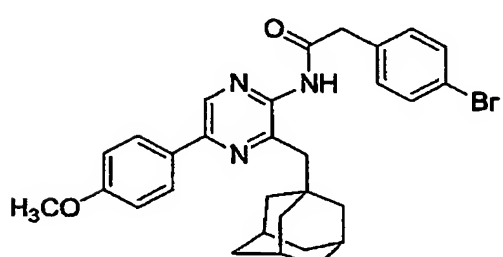
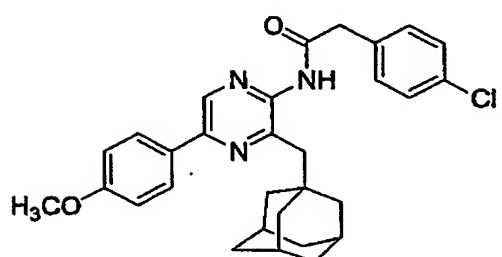
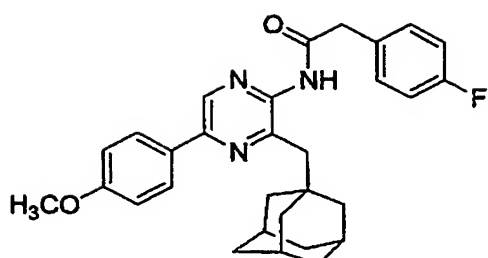
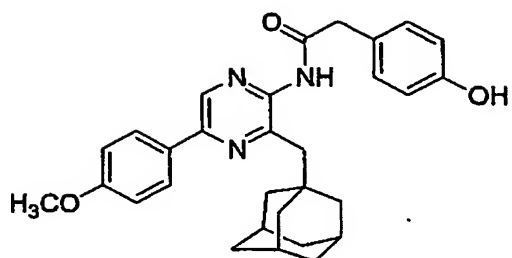
【0245】

【化 1 4 6】



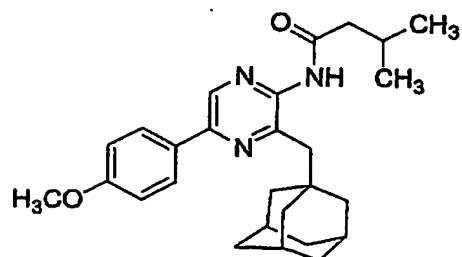
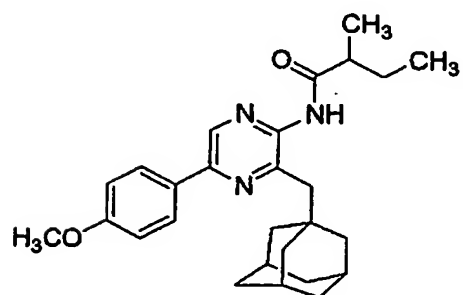
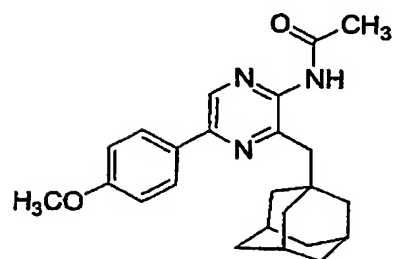
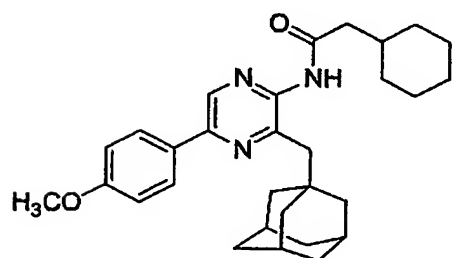
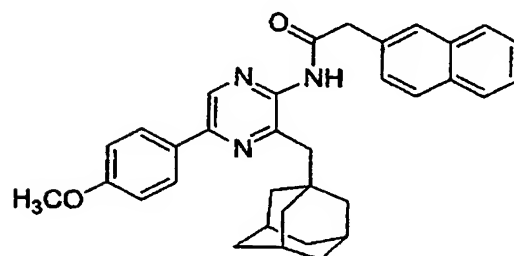
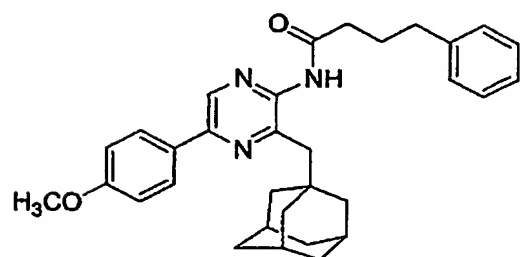
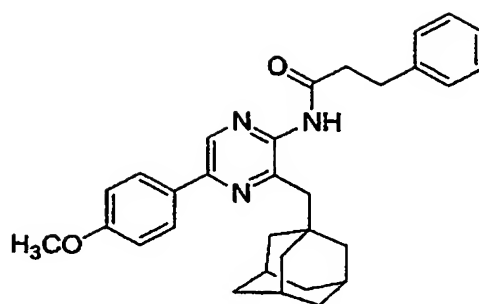
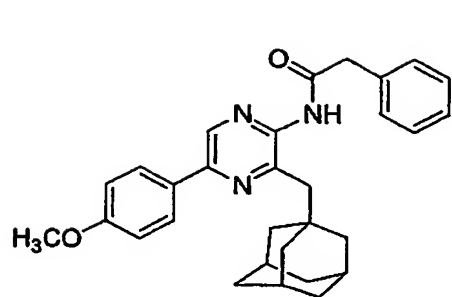
【 0 2 4 6 】

【化 1 4 7】



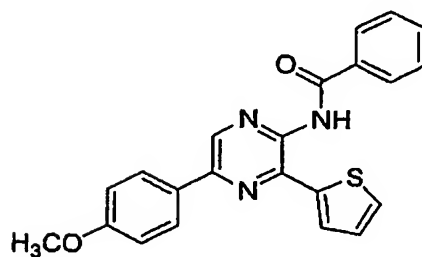
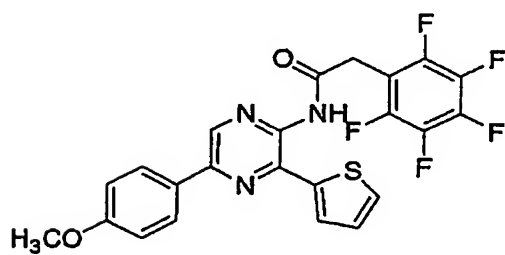
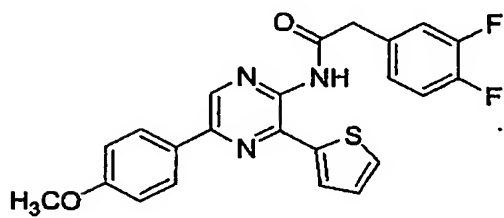
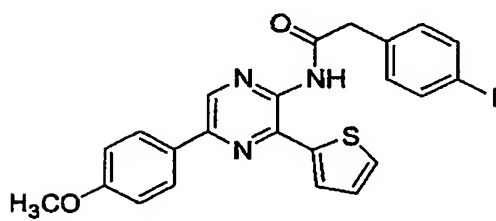
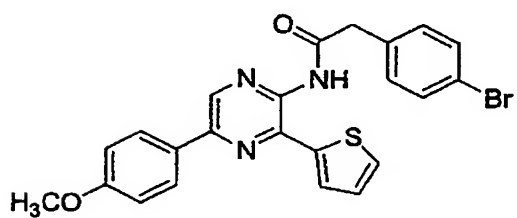
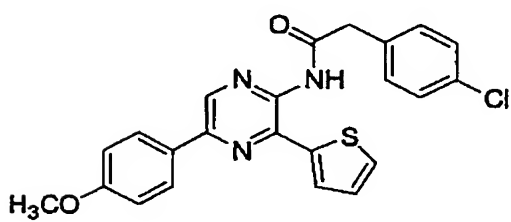
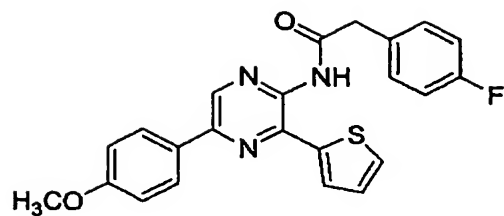
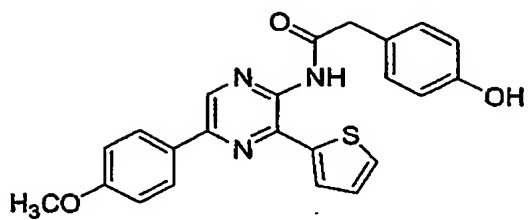
【0 2 4 7】

【化 148】



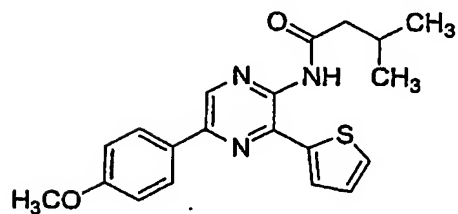
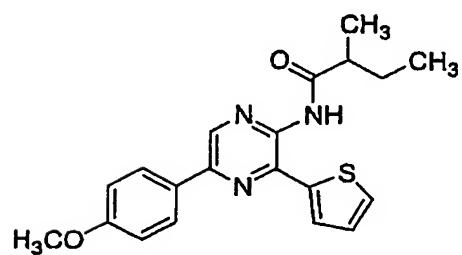
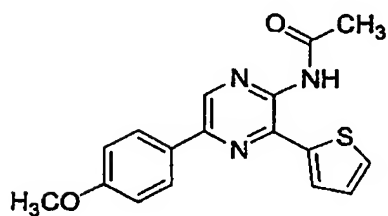
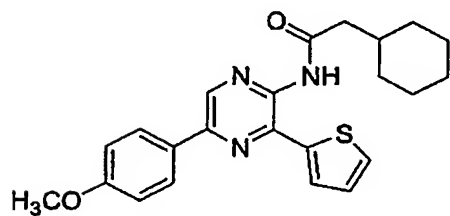
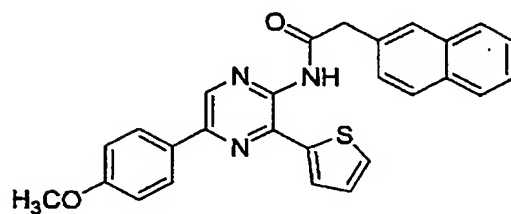
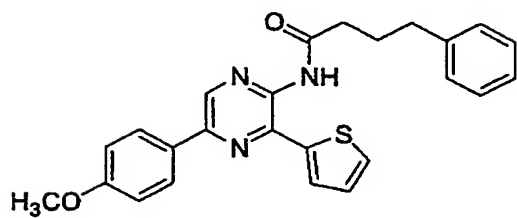
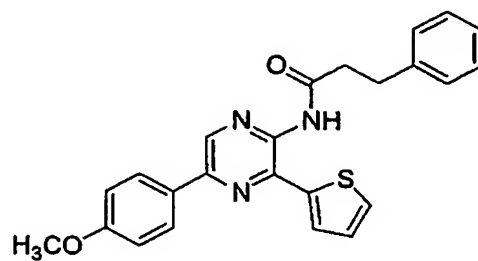
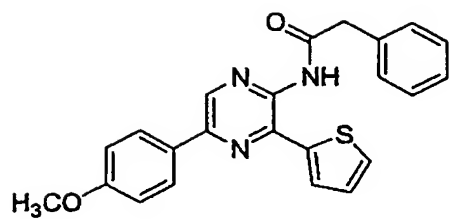
【0248】

【化 149】



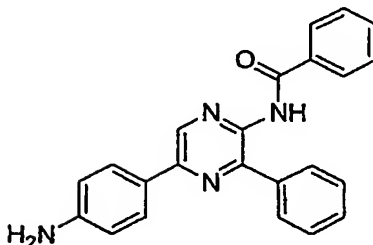
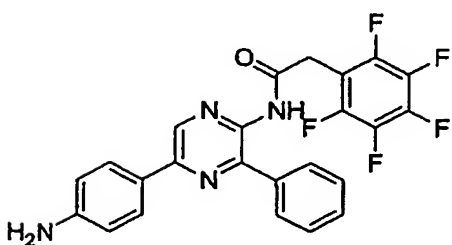
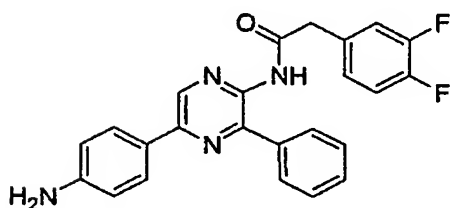
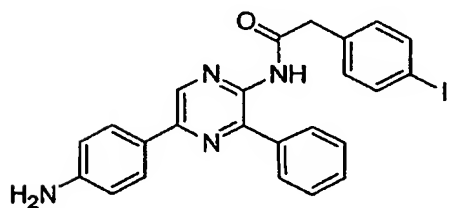
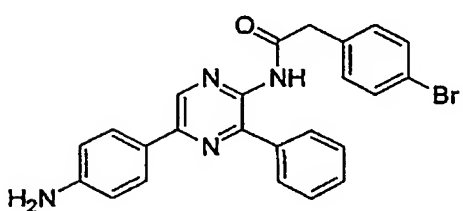
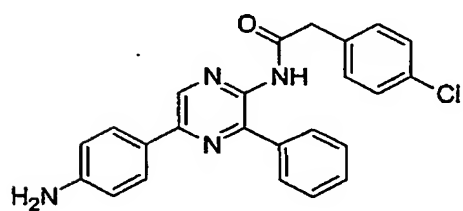
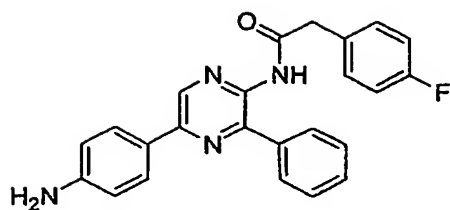
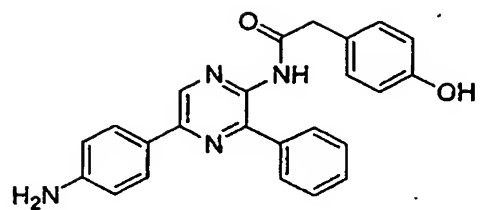
【 0 2 4 9 】

【化150】



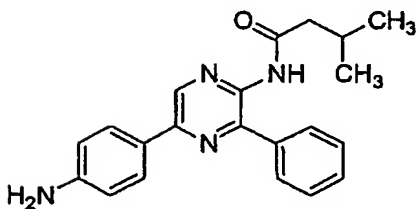
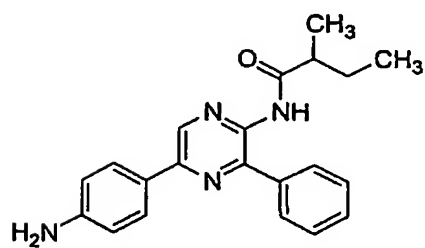
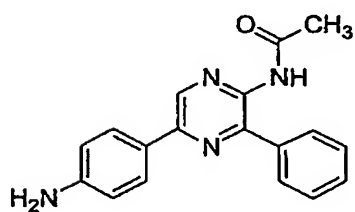
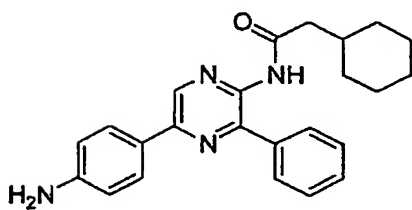
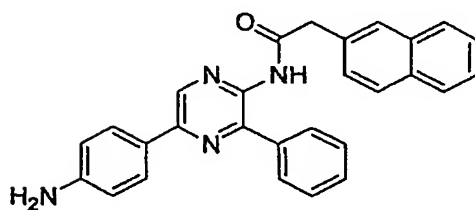
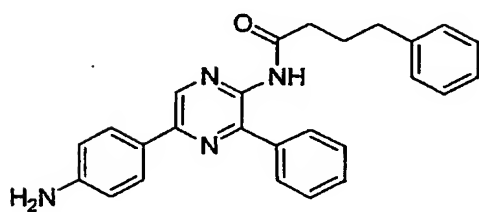
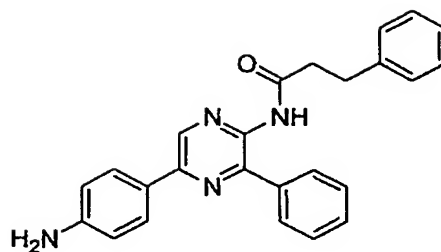
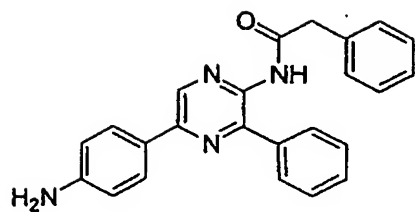
【0250】

【化151】



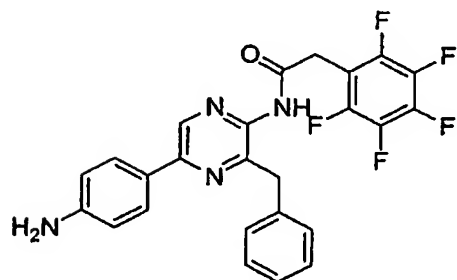
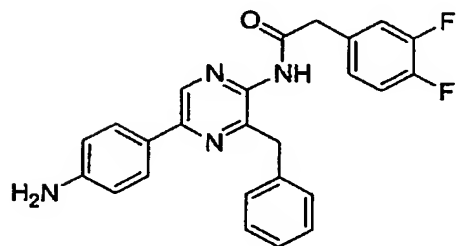
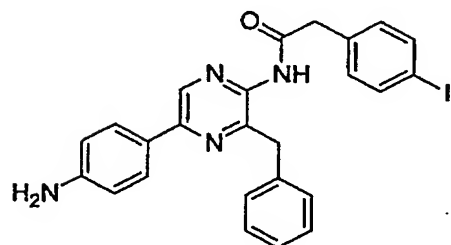
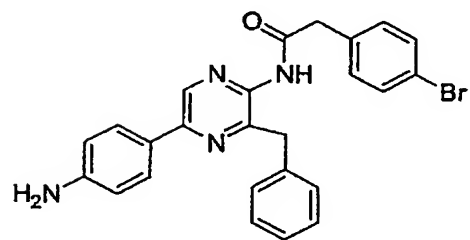
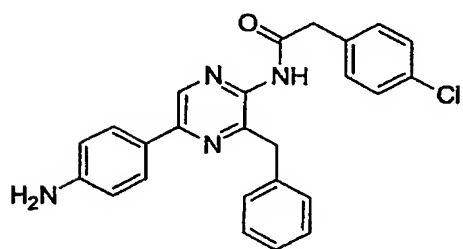
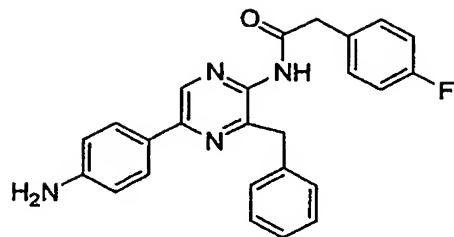
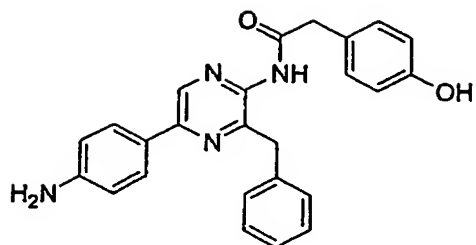
【0251】

【化 152】

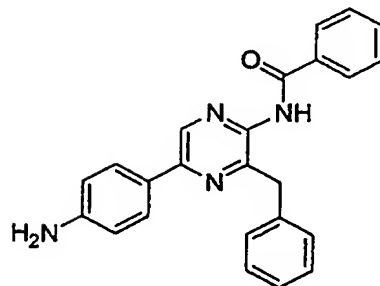


【0252】

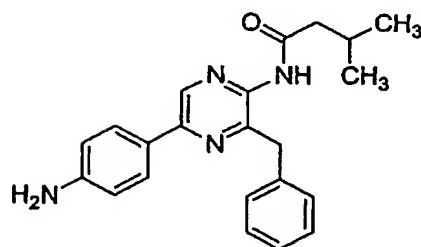
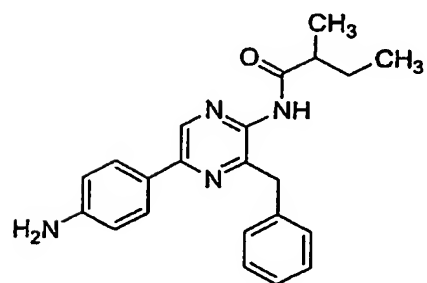
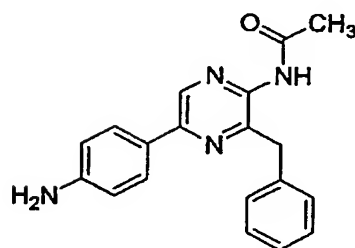
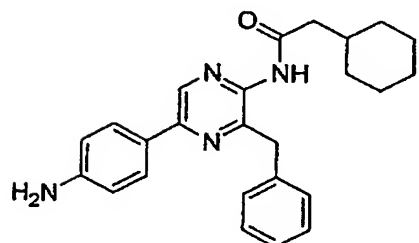
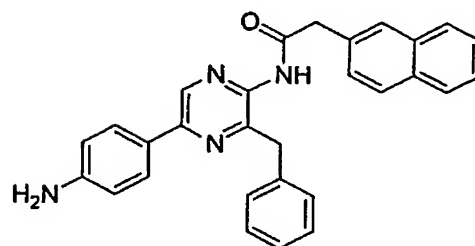
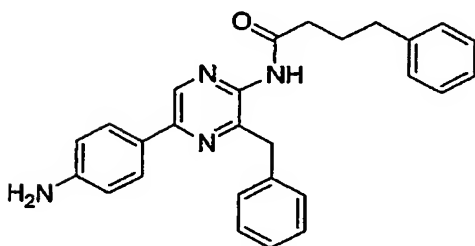
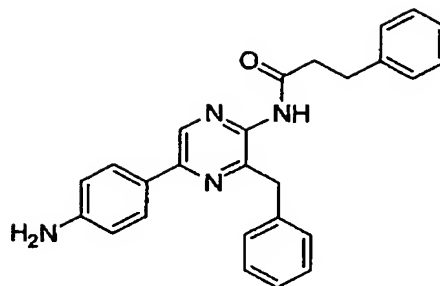
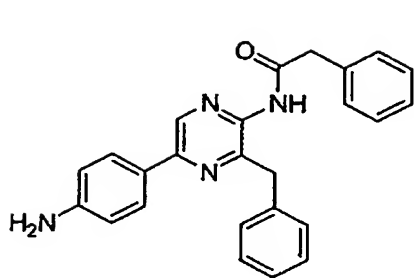
【化 153】



【0253】

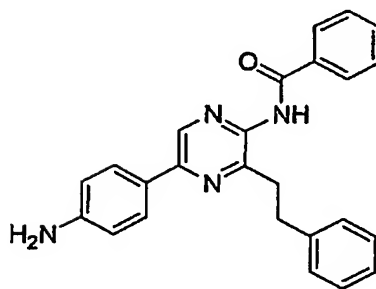
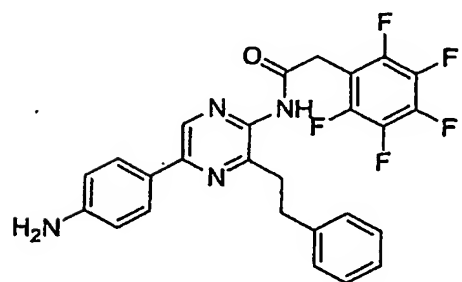
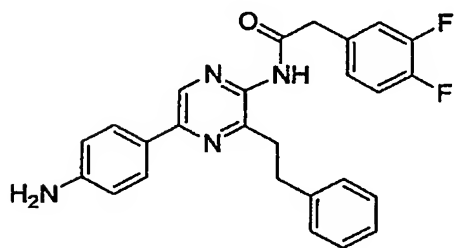
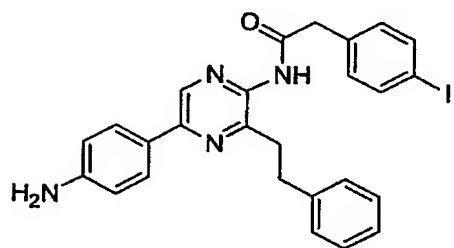
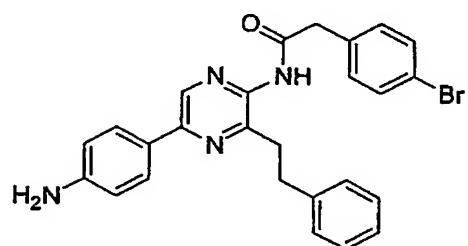
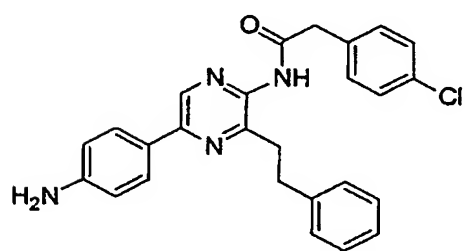
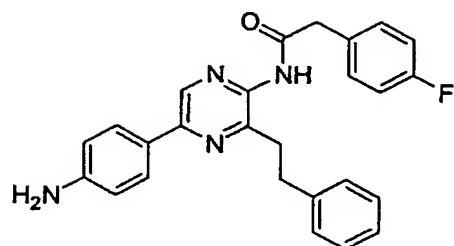
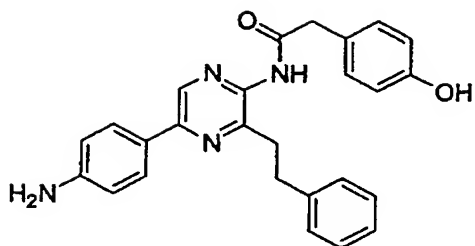


【化 154】



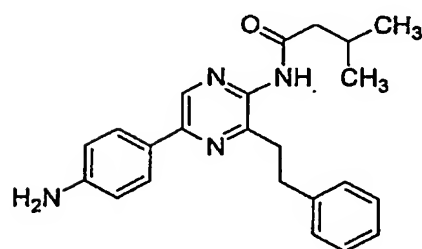
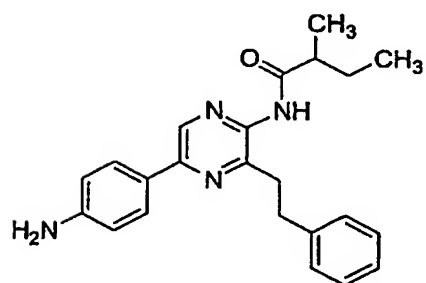
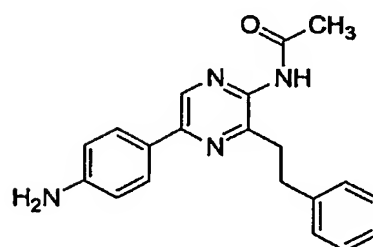
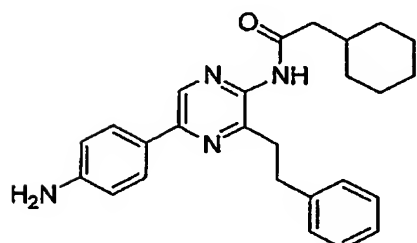
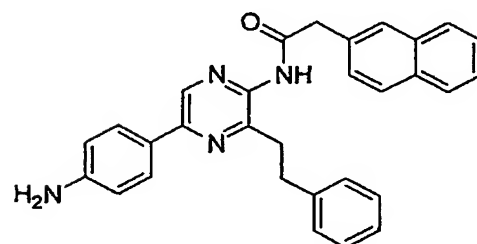
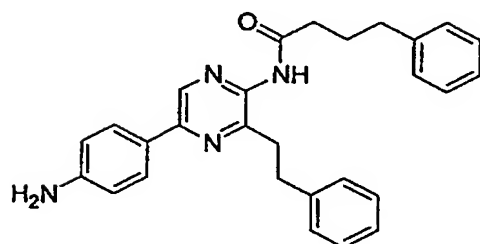
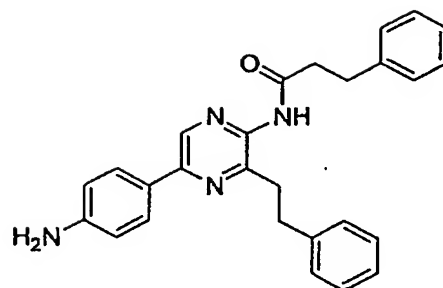
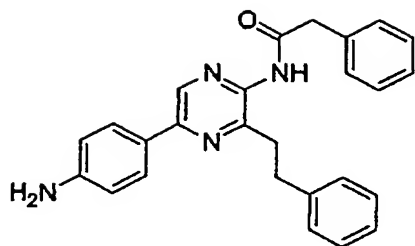
【0254】

【化155】



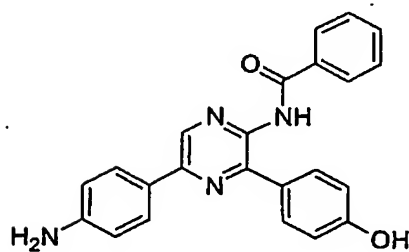
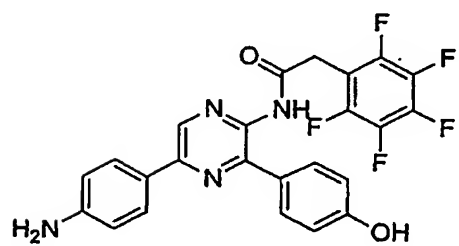
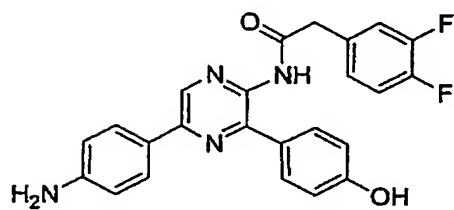
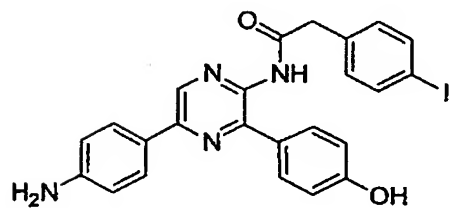
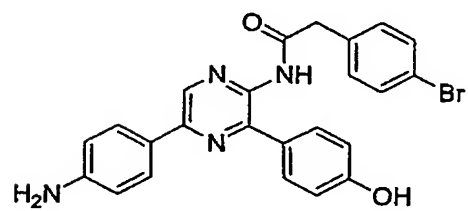
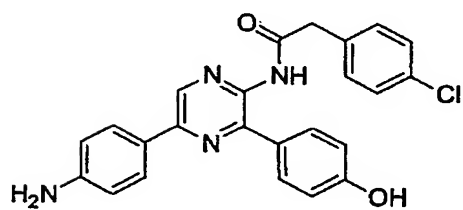
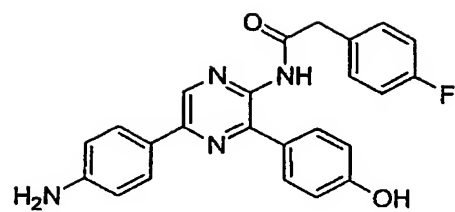
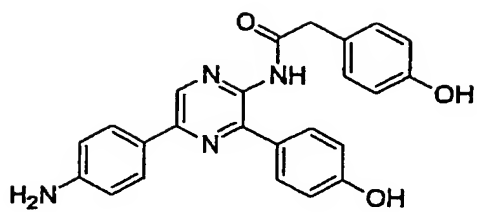
【0255】

【化 156】



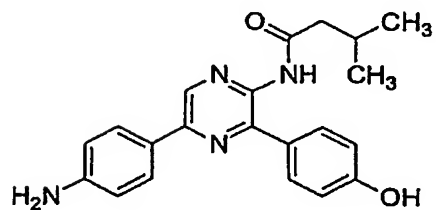
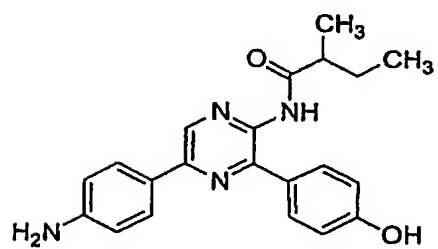
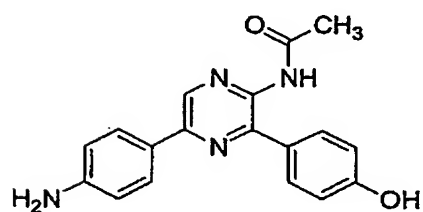
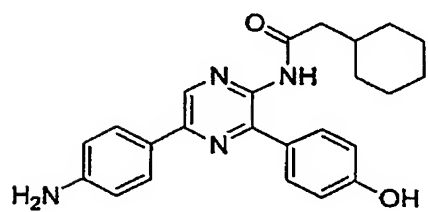
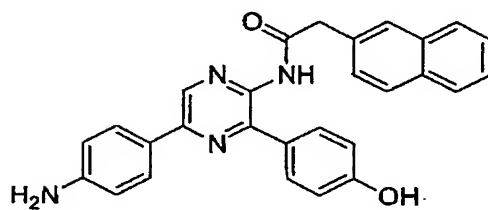
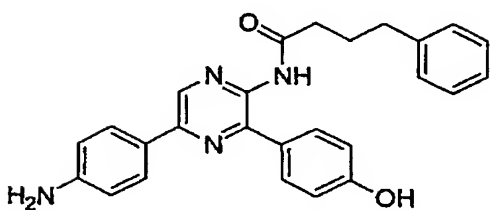
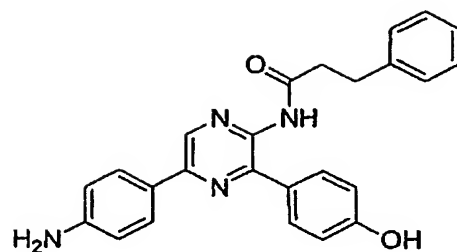
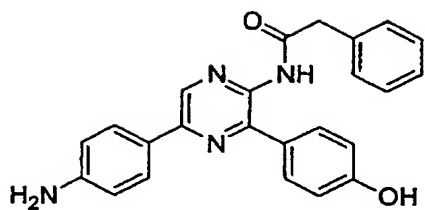
【0256】

【化 157】



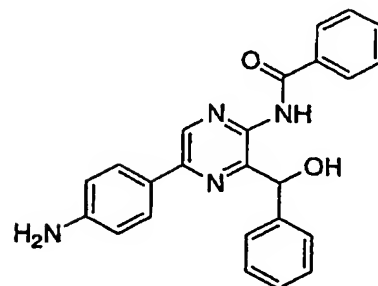
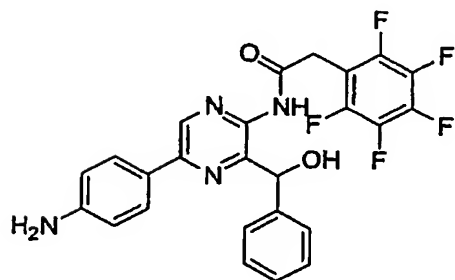
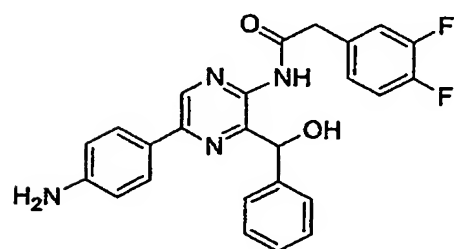
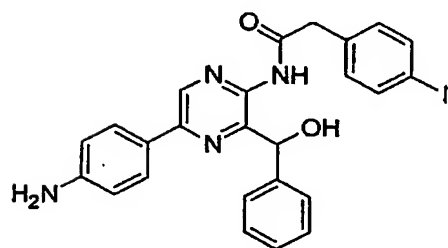
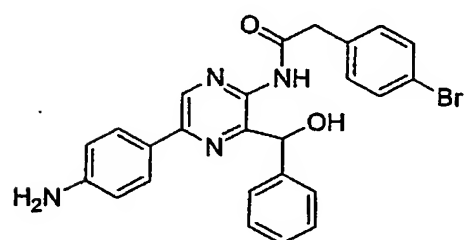
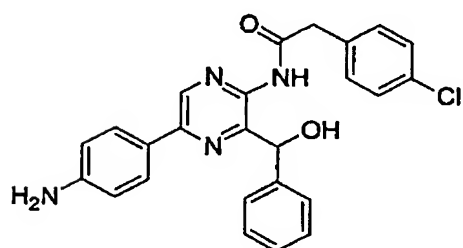
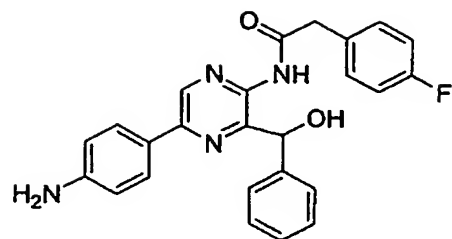
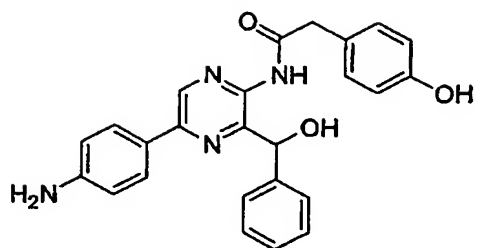
【0257】

【化158】



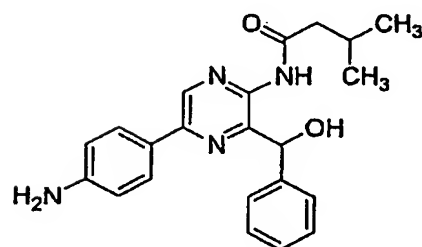
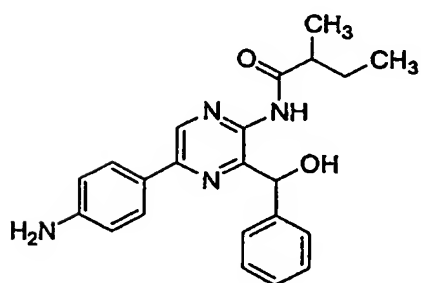
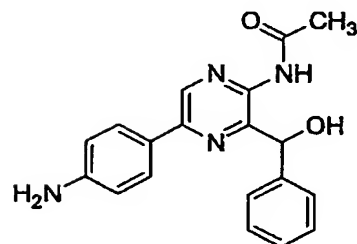
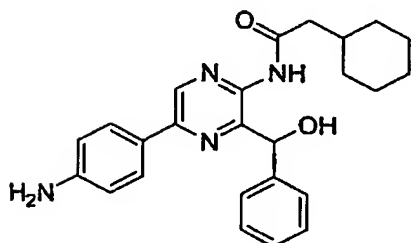
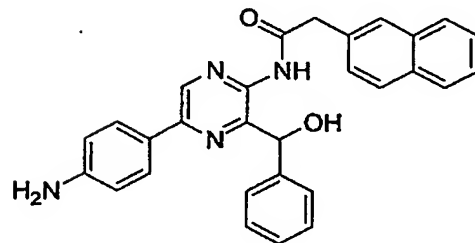
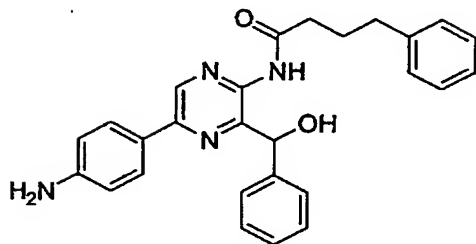
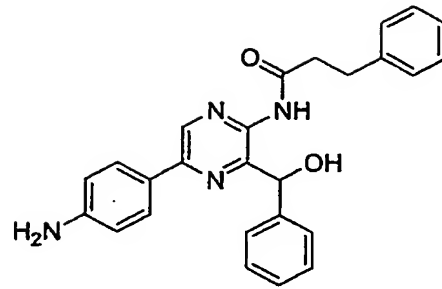
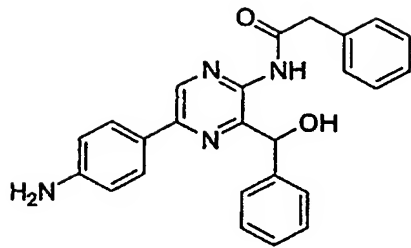
【0258】

【化 159】



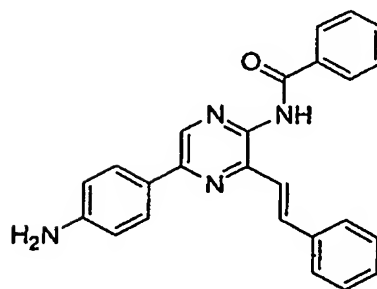
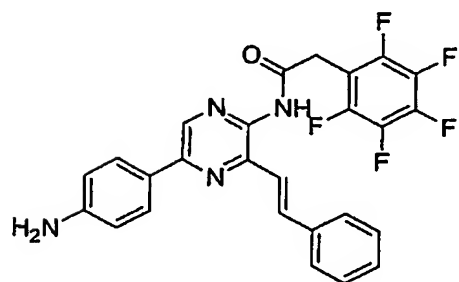
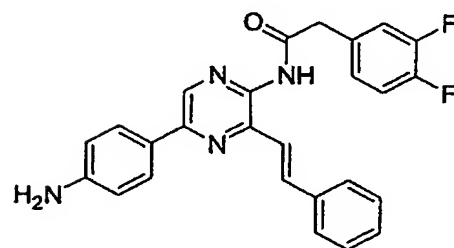
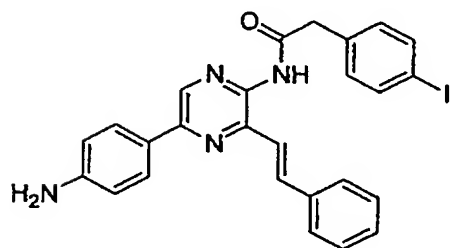
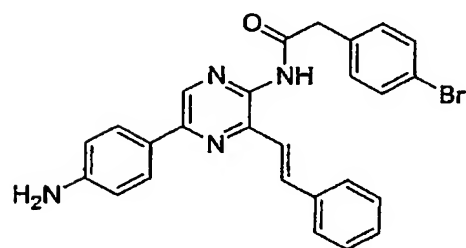
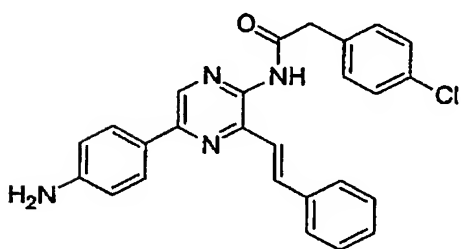
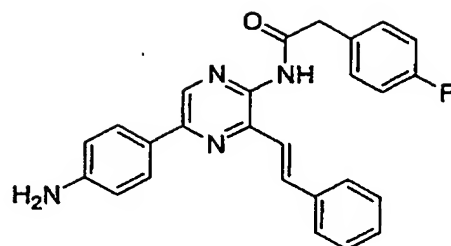
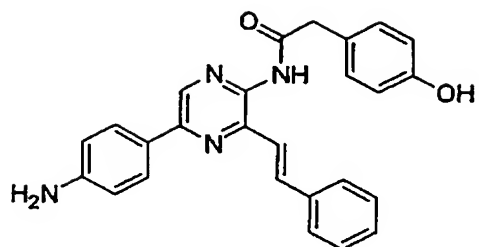
【0259】

【化160】



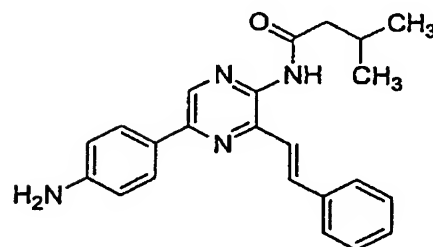
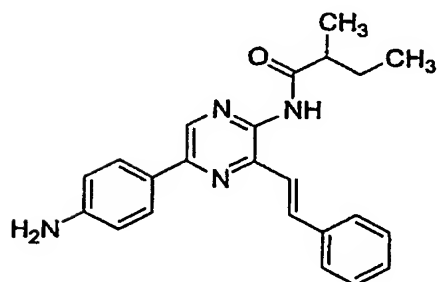
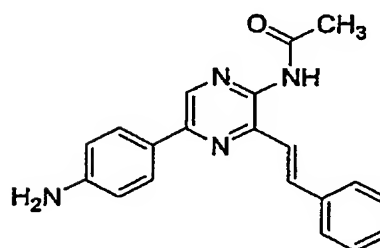
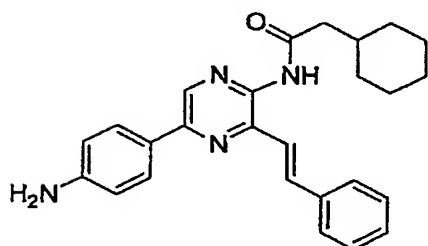
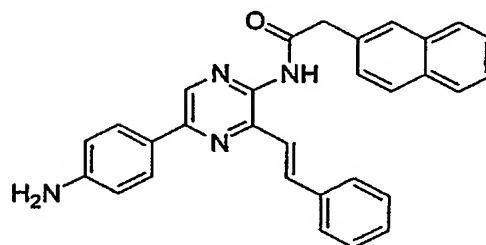
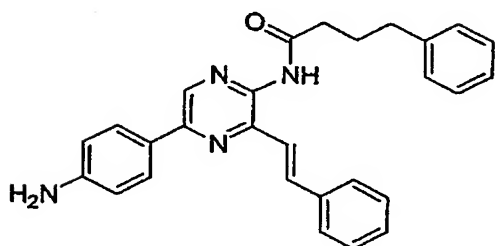
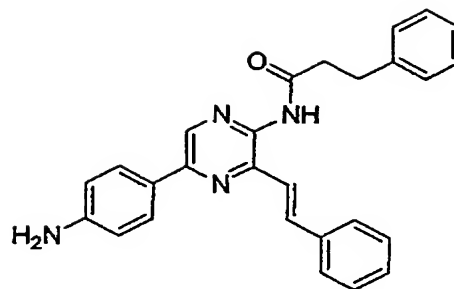
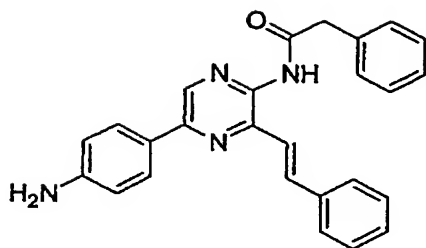
【0260】

【化 161】



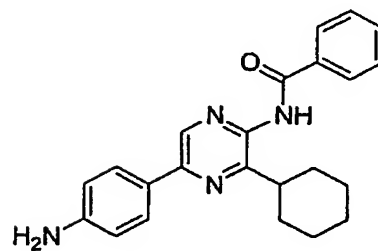
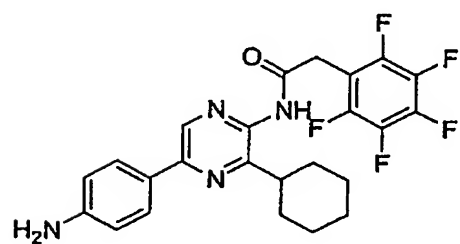
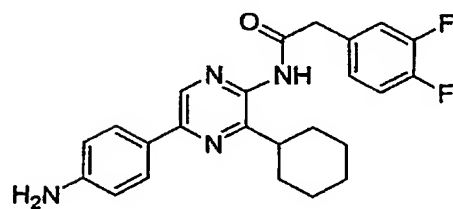
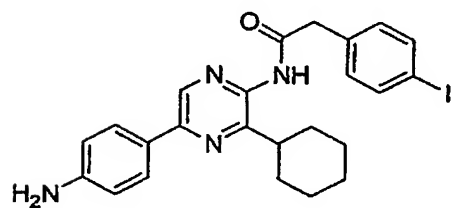
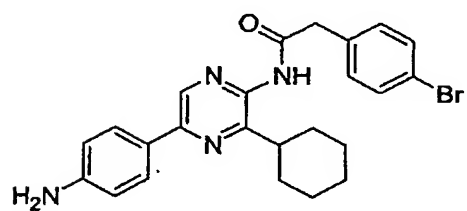
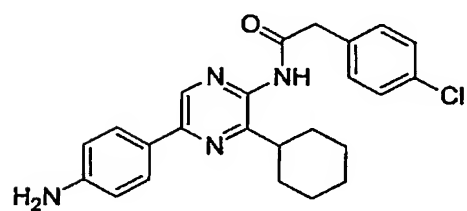
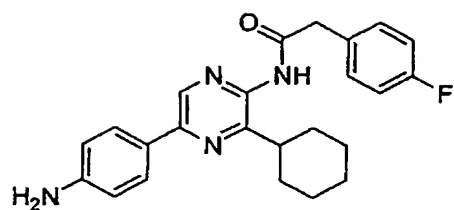
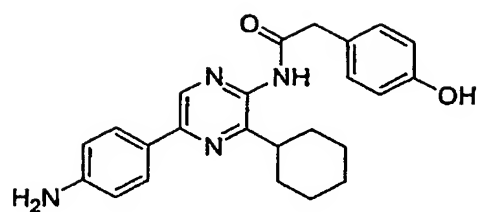
【0261】

【化162】



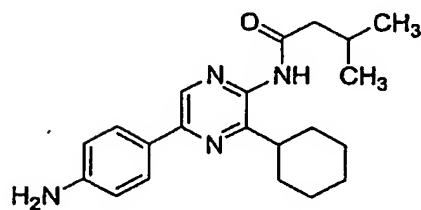
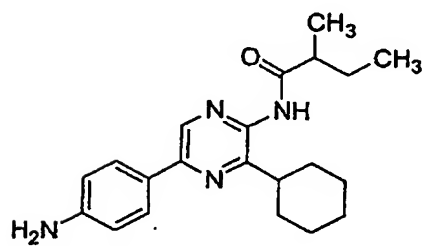
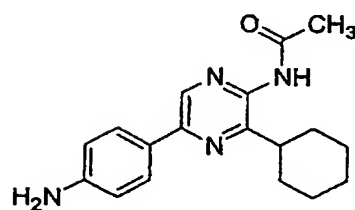
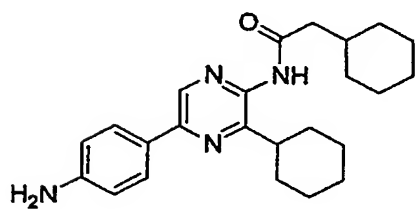
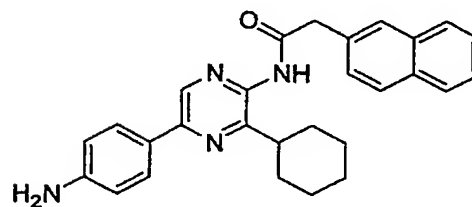
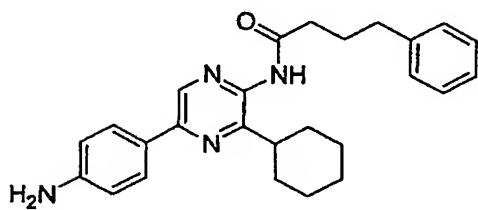
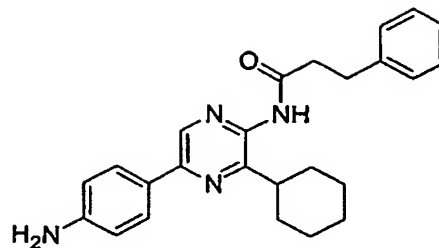
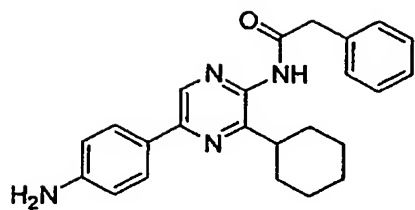
【0262】

【化163】



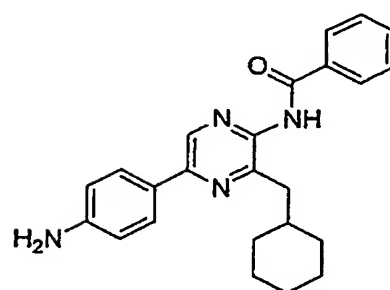
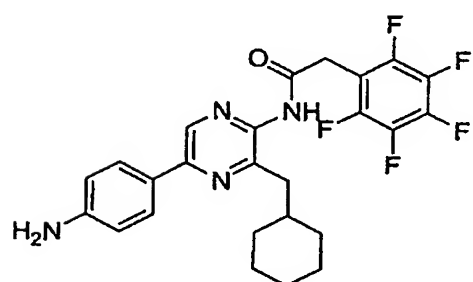
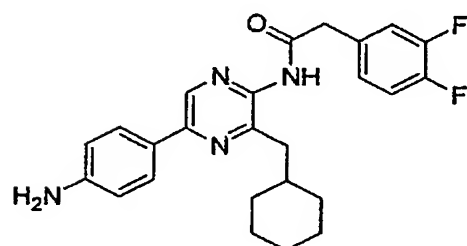
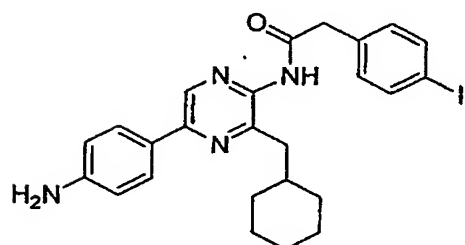
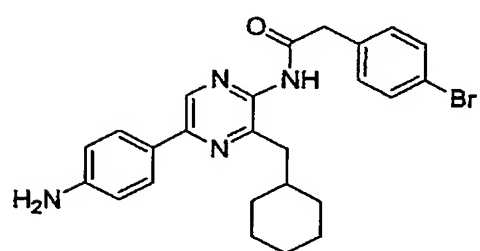
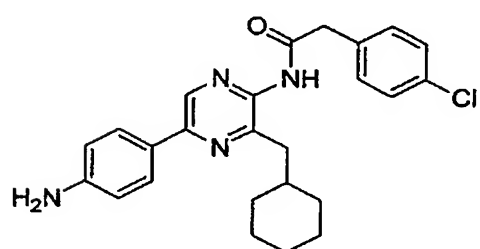
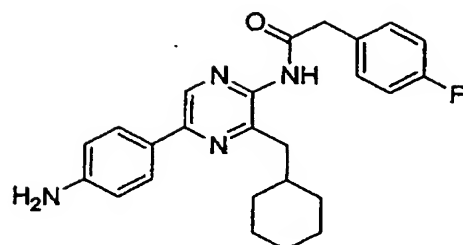
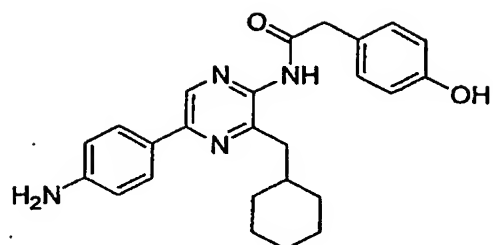
【0263】

【化 164】



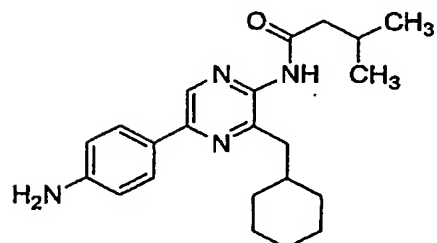
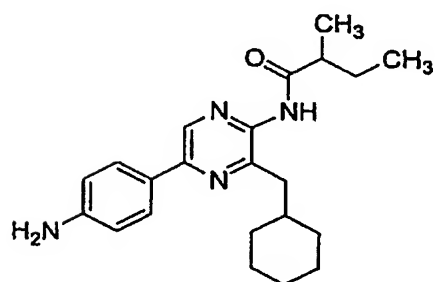
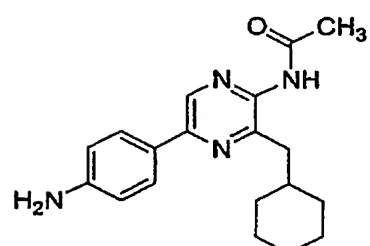
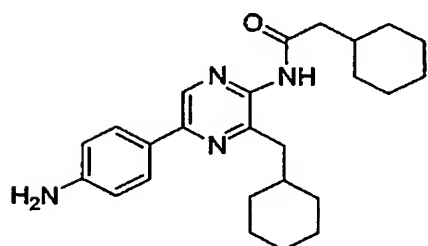
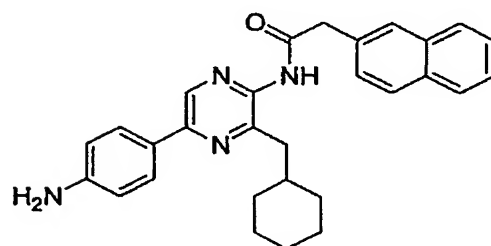
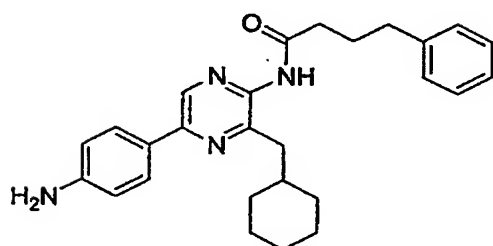
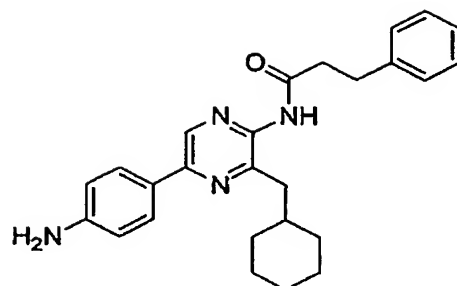
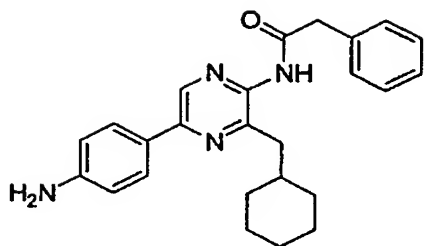
【0264】

【化165】



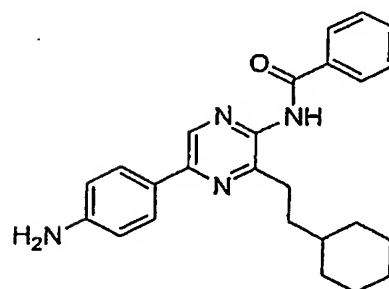
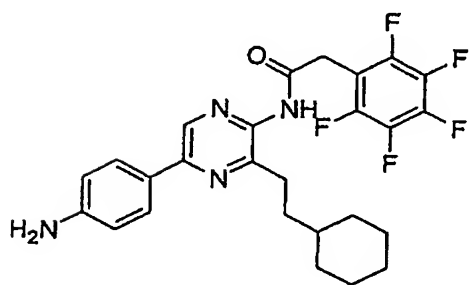
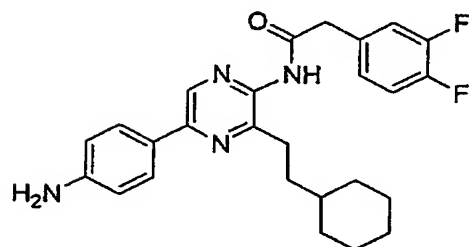
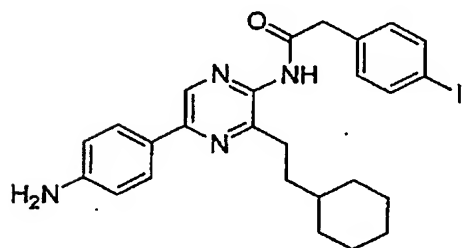
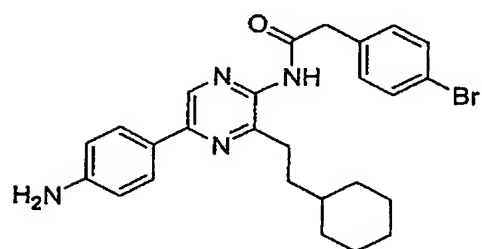
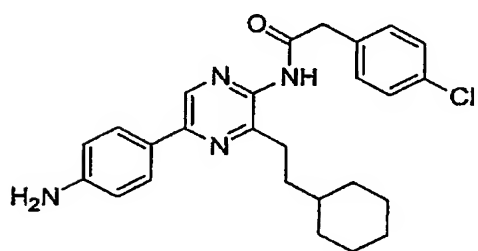
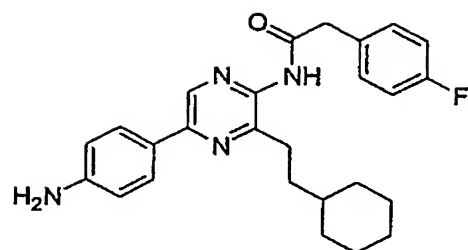
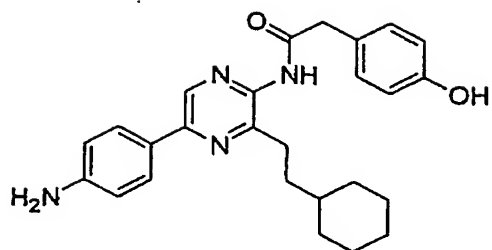
【0265】

【化166】



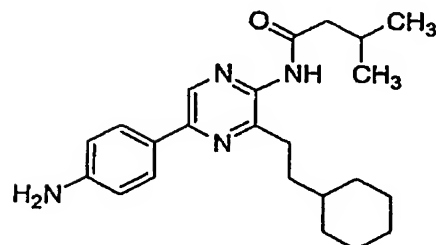
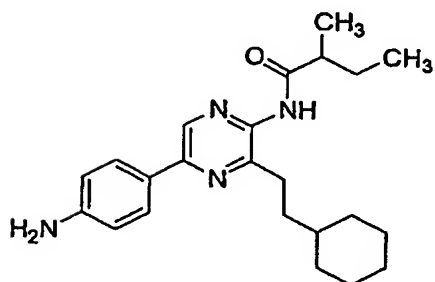
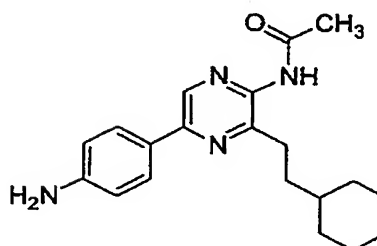
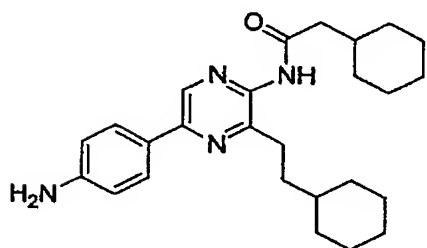
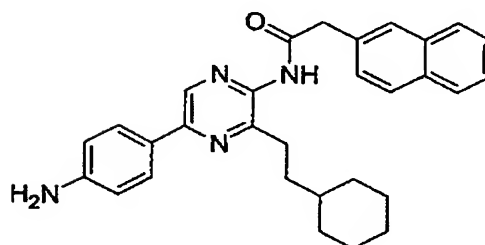
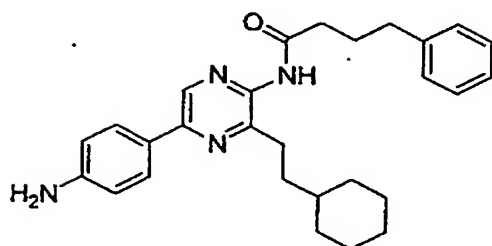
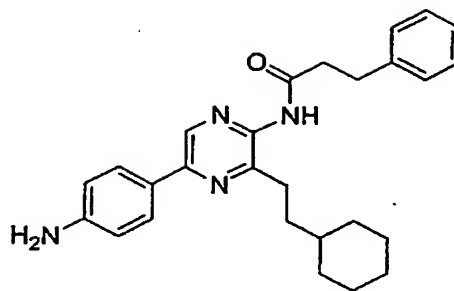
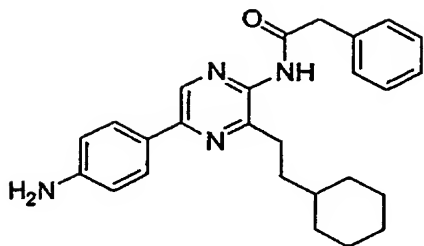
【0266】

【化 167】



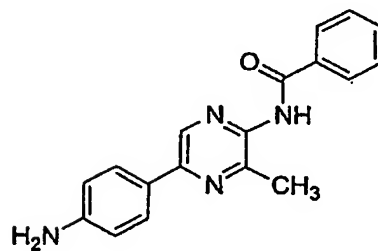
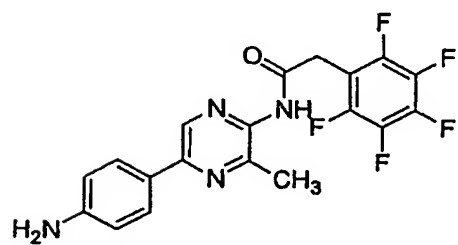
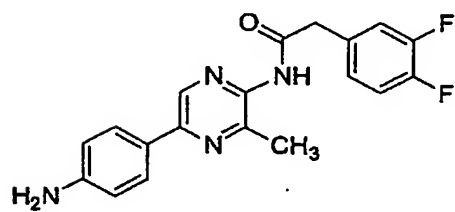
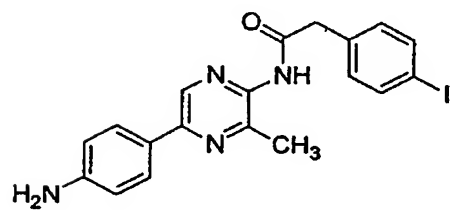
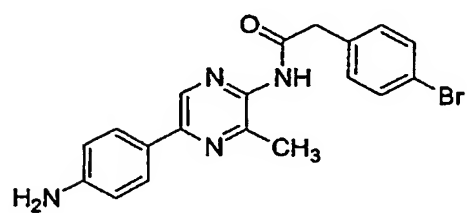
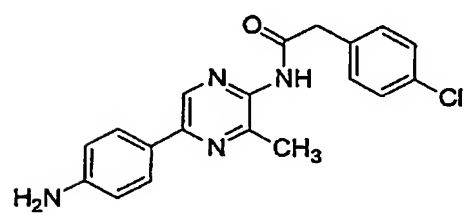
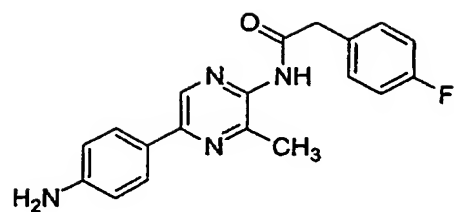
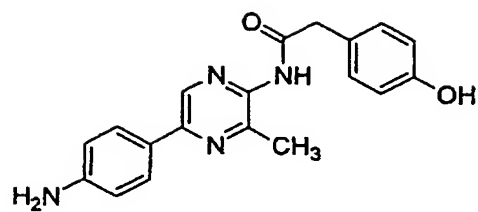
【0267】

【化168】



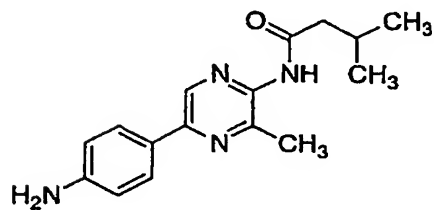
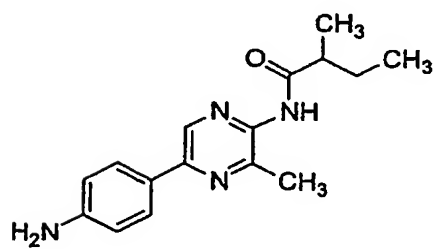
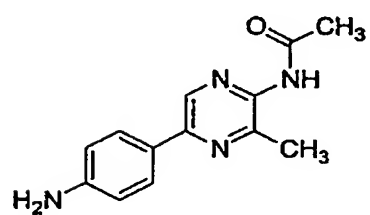
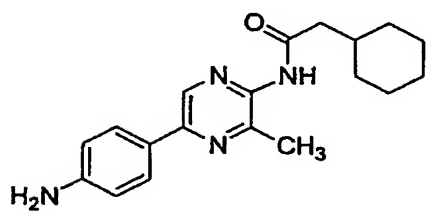
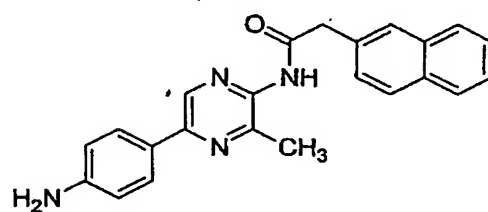
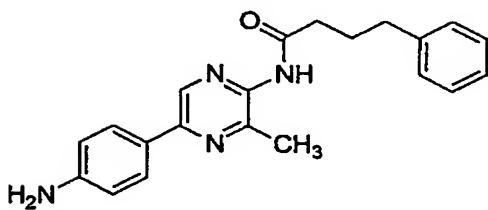
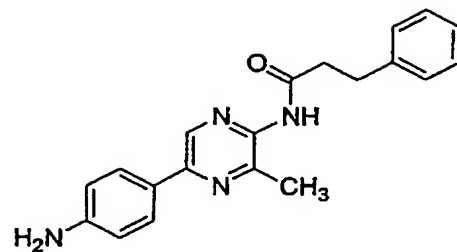
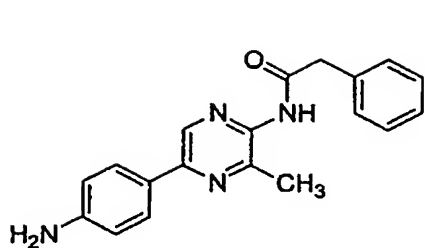
【0268】

【化 169】



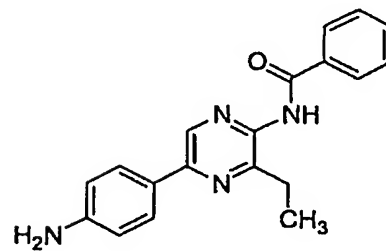
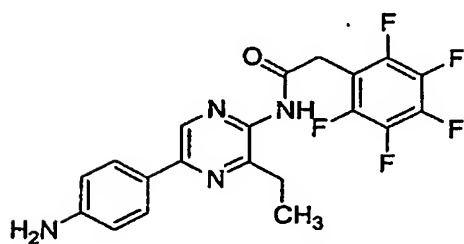
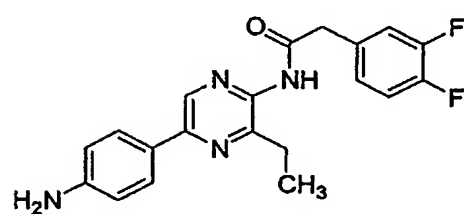
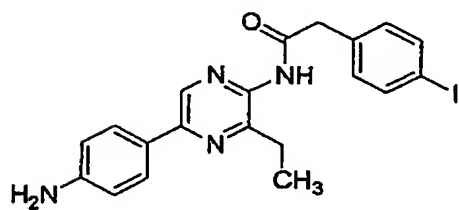
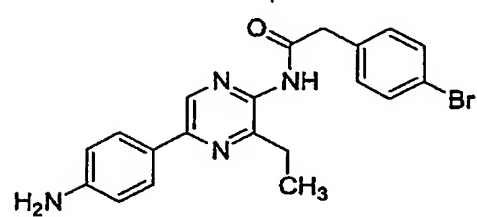
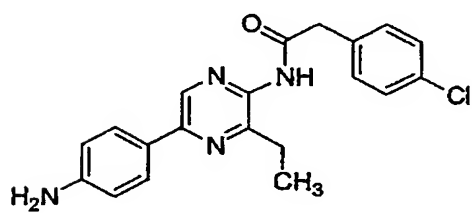
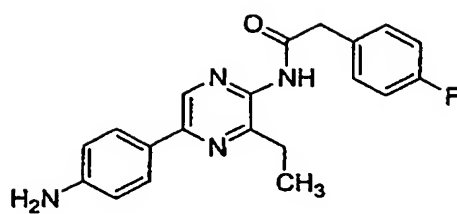
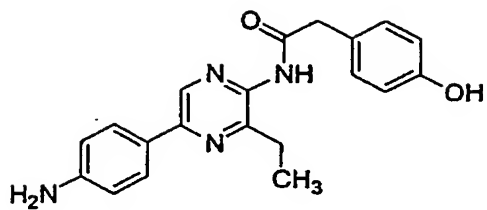
【0269】

【化 170】



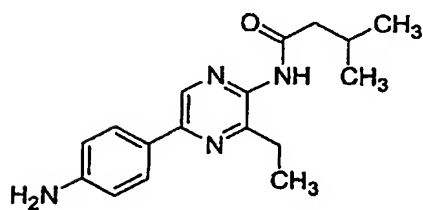
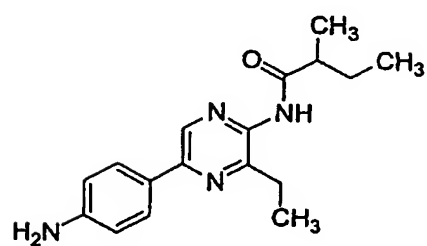
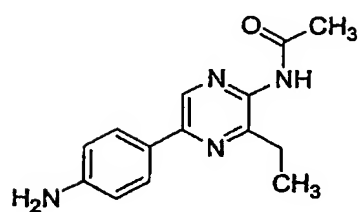
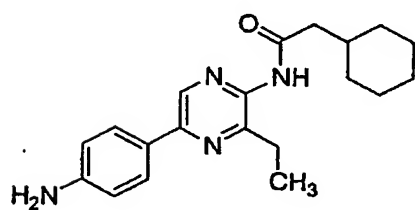
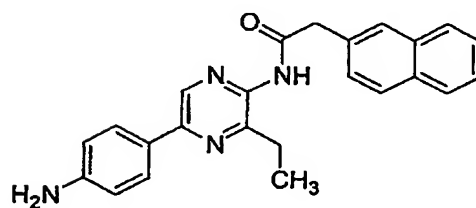
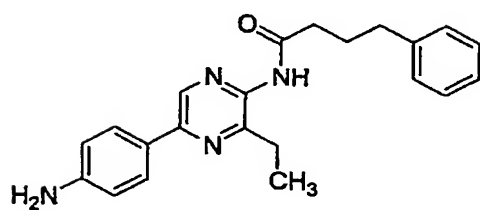
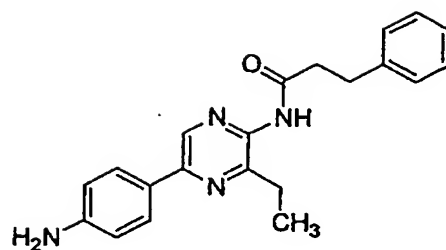
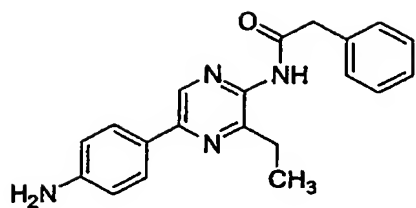
【0270】

【化 171】



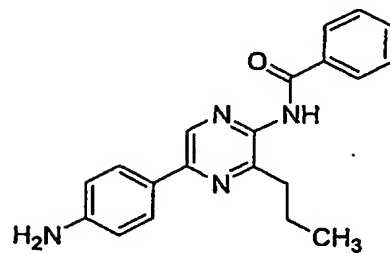
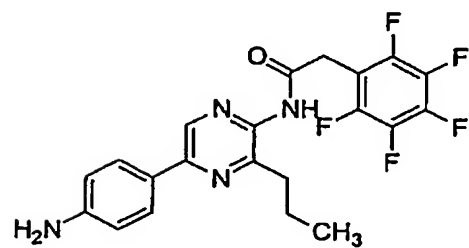
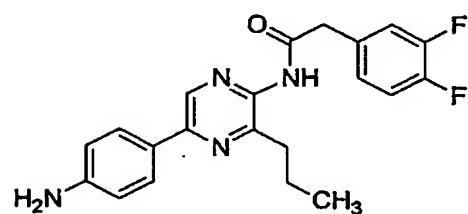
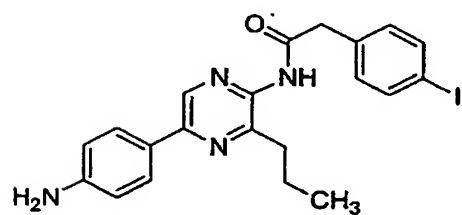
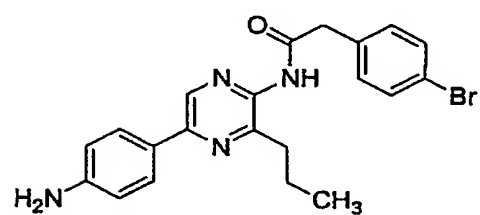
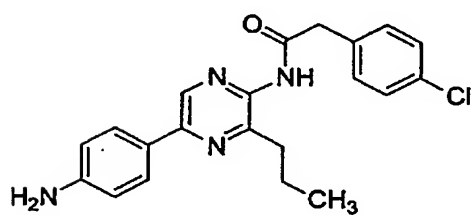
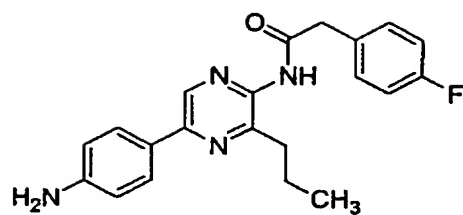
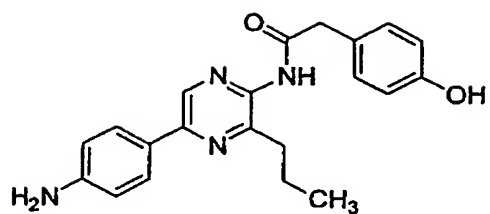
【0271】

【化 172】



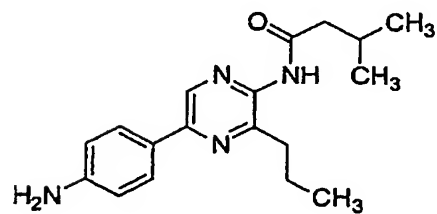
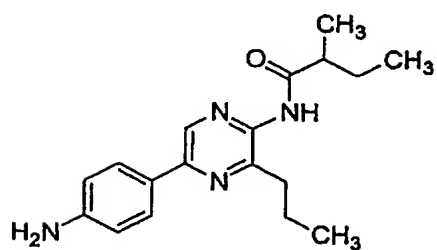
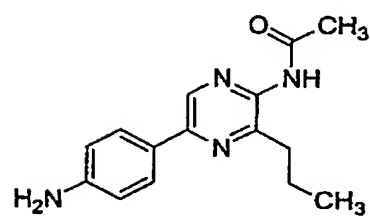
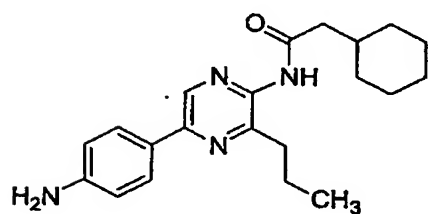
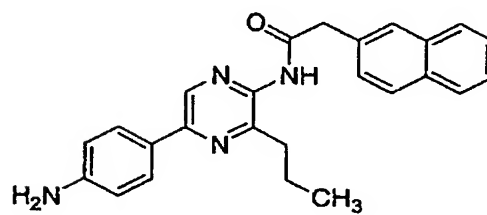
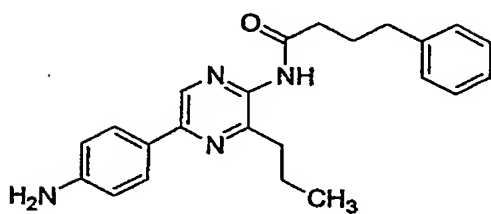
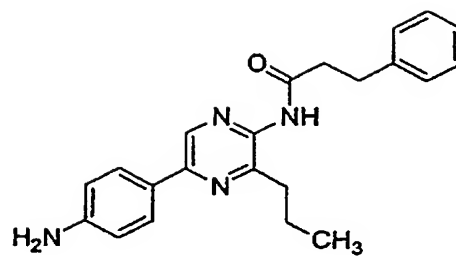
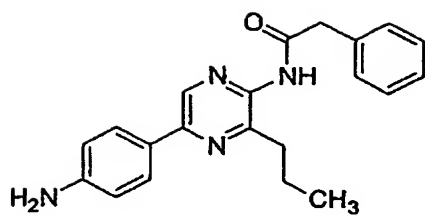
【 0 2 7 2 】

【化 173】



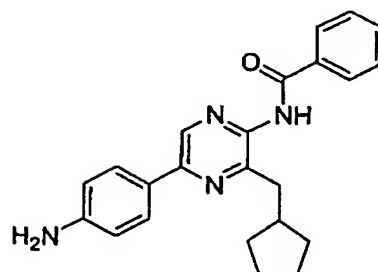
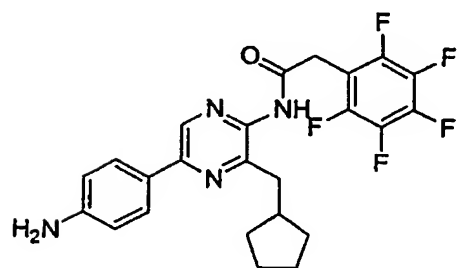
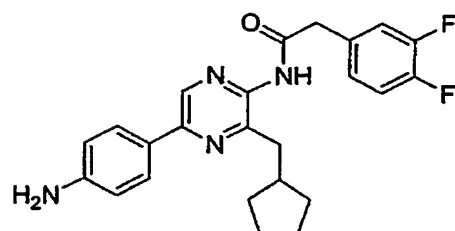
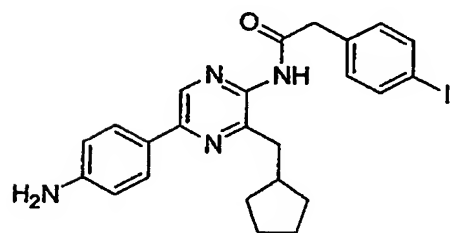
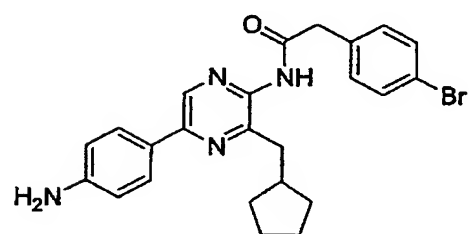
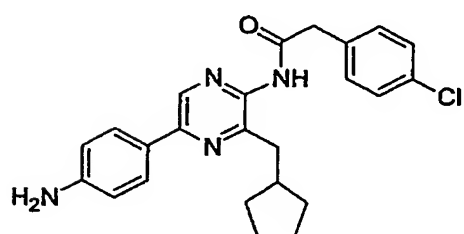
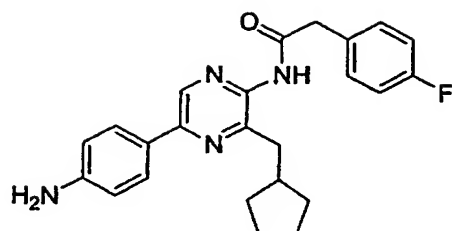
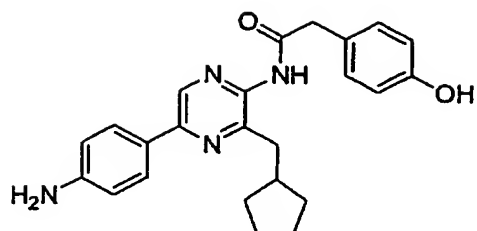
【0273】

【化 174】



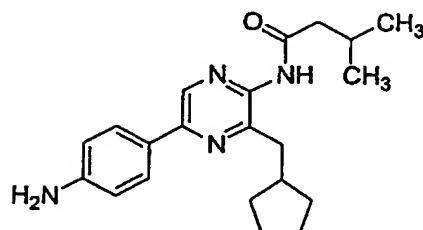
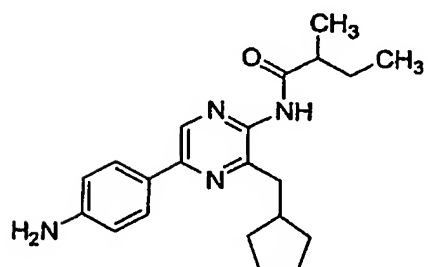
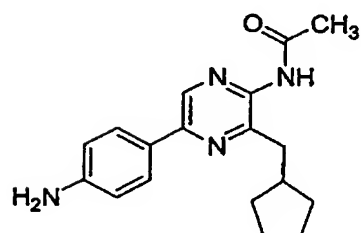
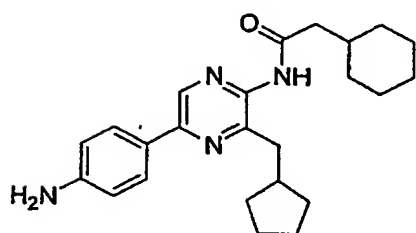
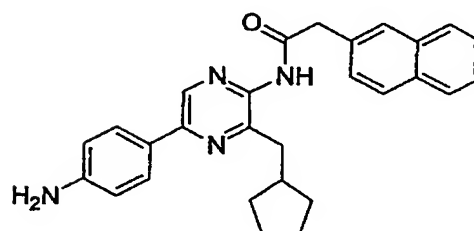
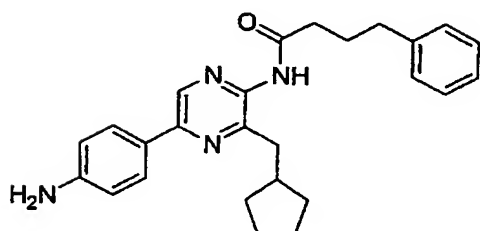
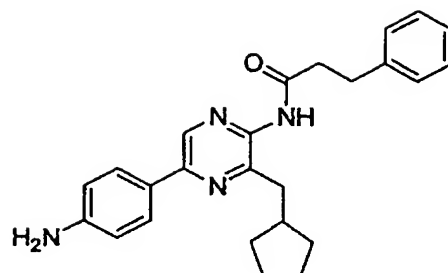
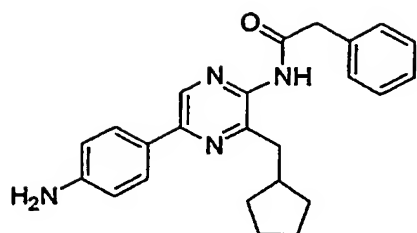
【0274】

【化175】



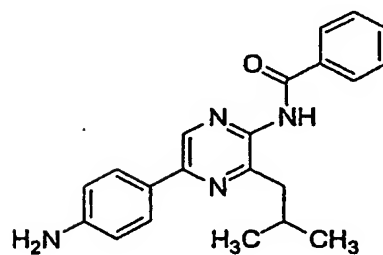
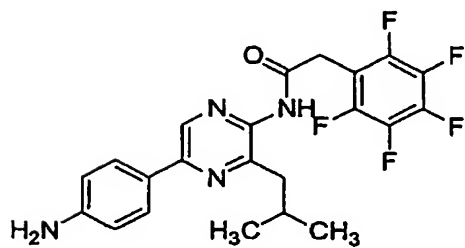
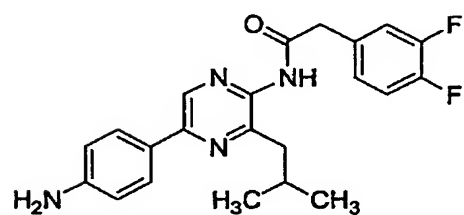
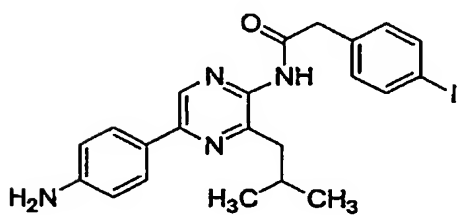
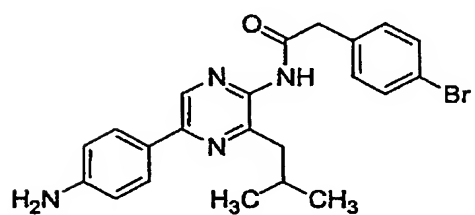
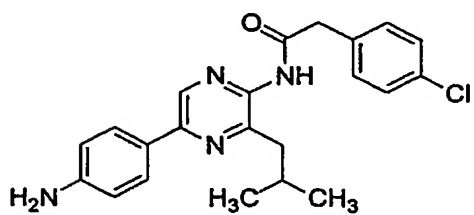
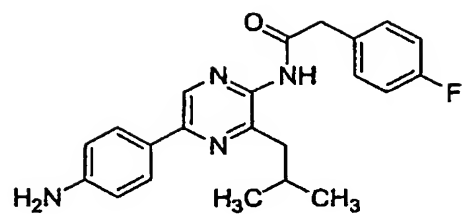
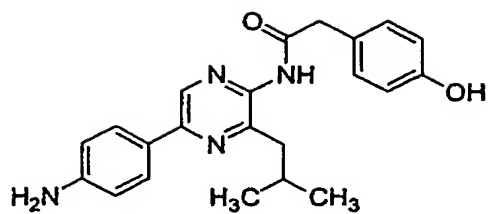
【0275】

【化176】



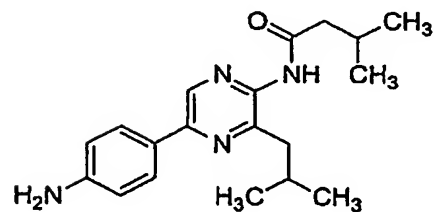
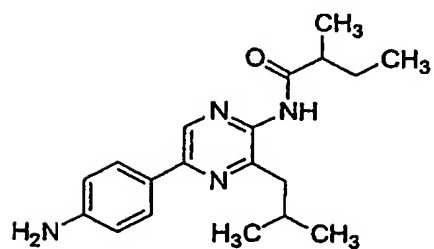
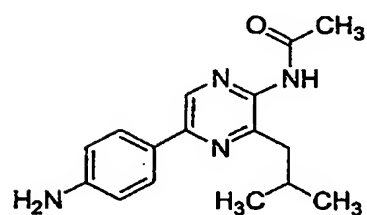
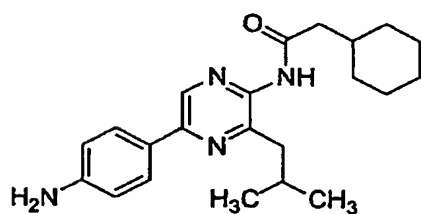
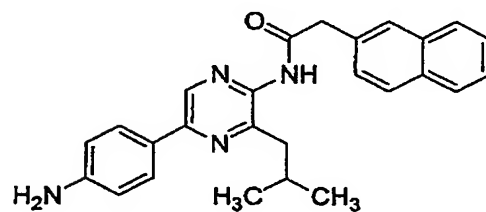
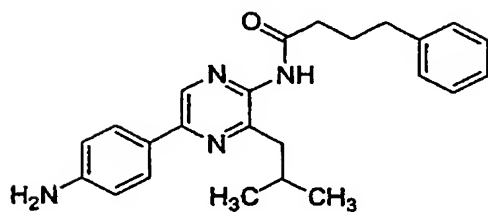
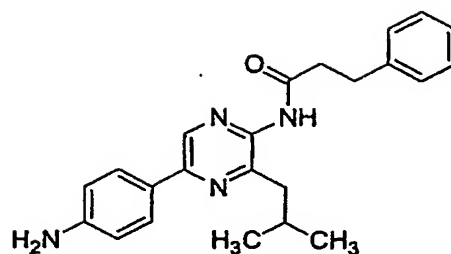
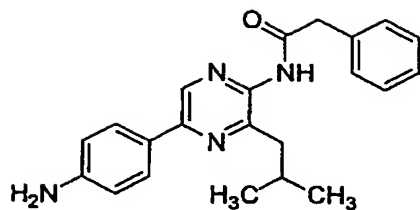
【0276】

【化177】



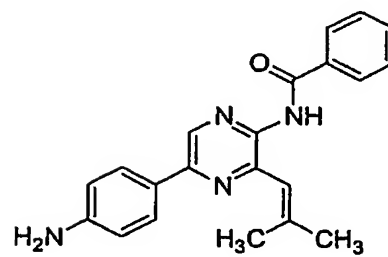
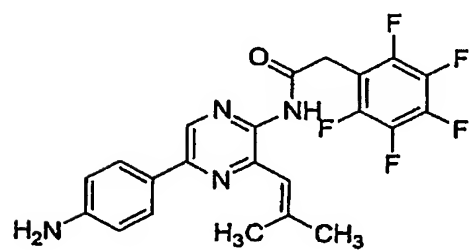
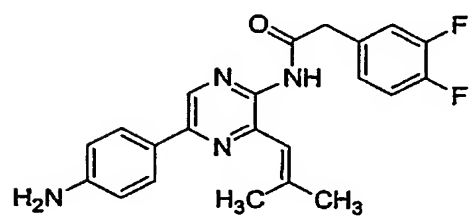
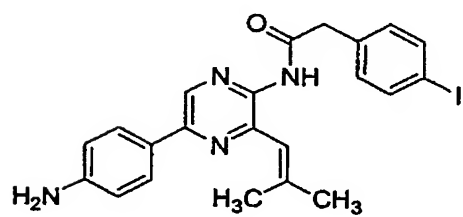
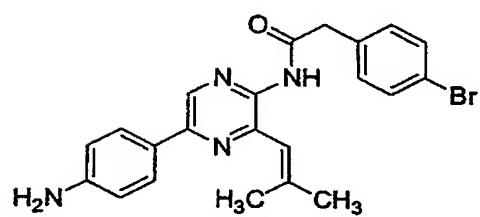
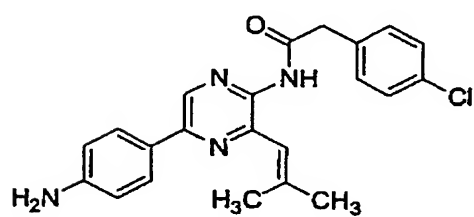
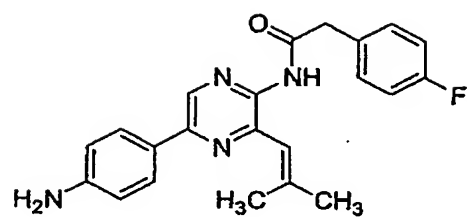
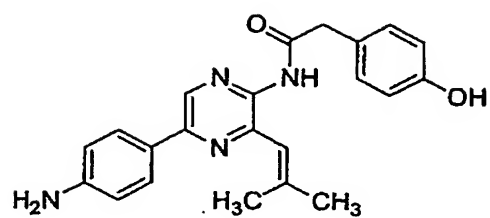
【0277】

【化 178】



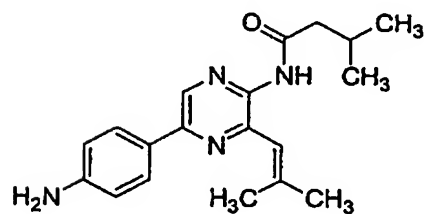
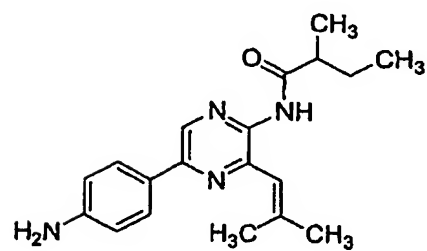
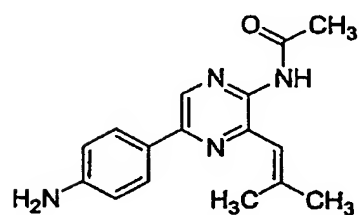
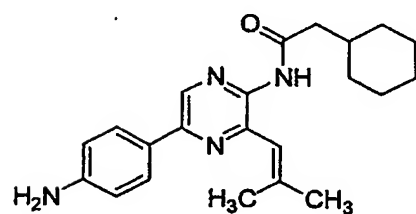
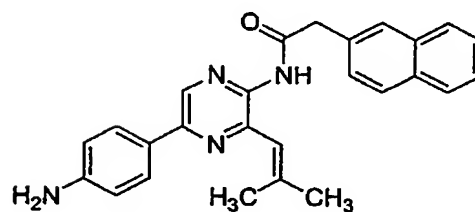
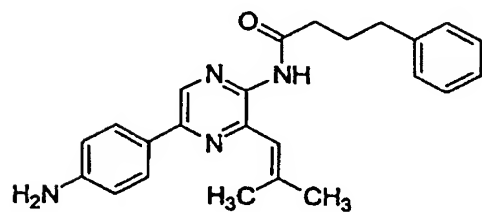
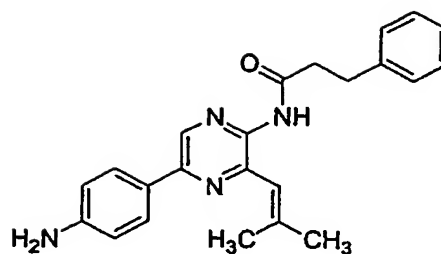
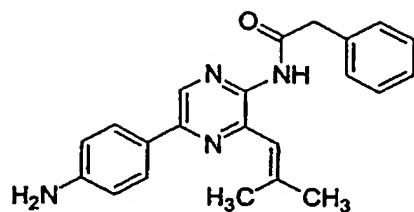
【0278】

【化179】



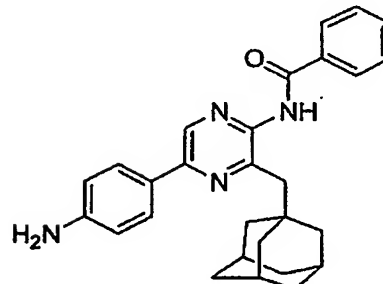
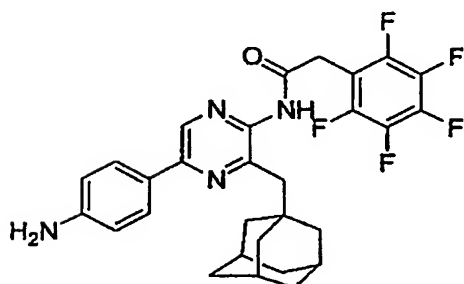
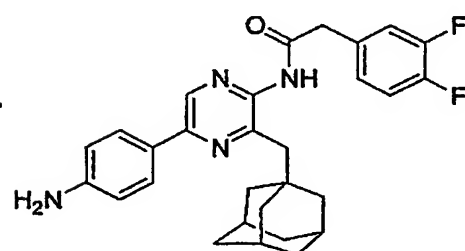
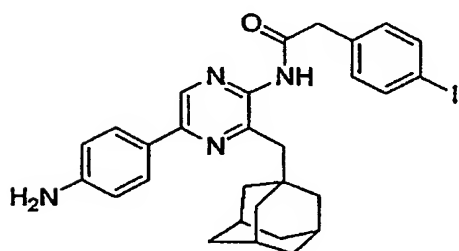
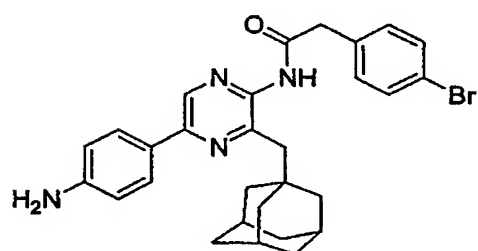
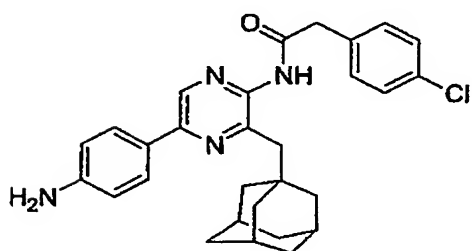
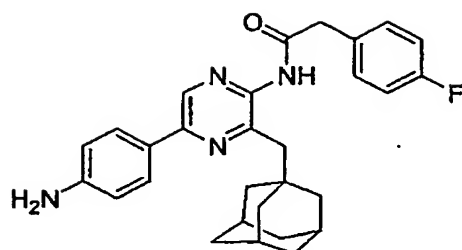
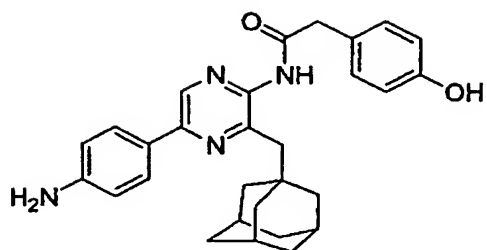
【0279】

【化180】



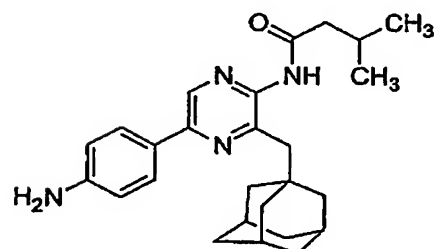
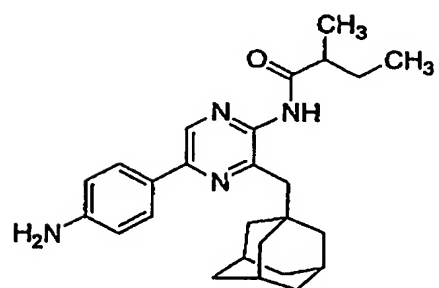
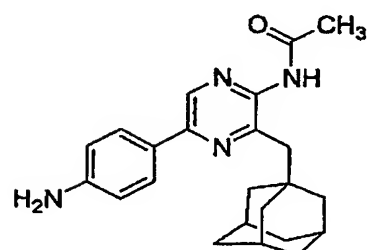
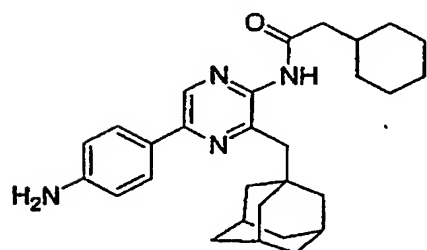
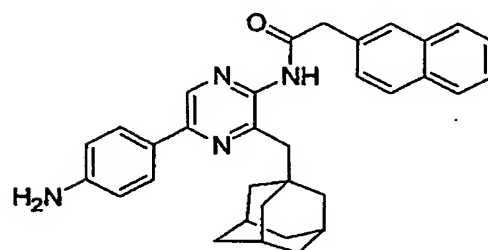
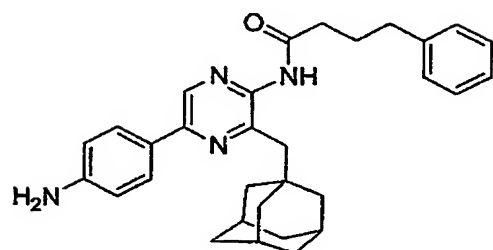
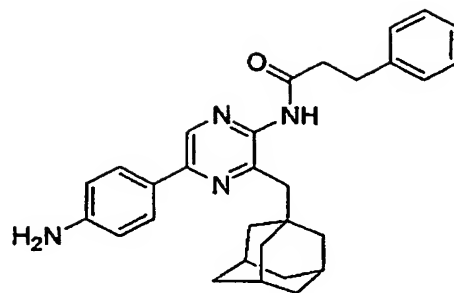
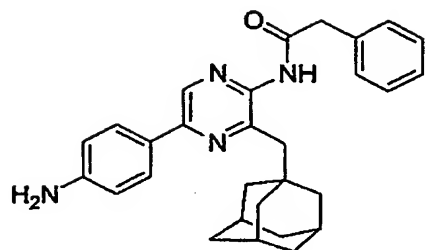
【0280】

【化181】



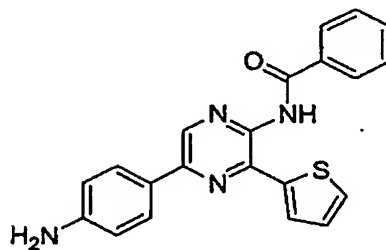
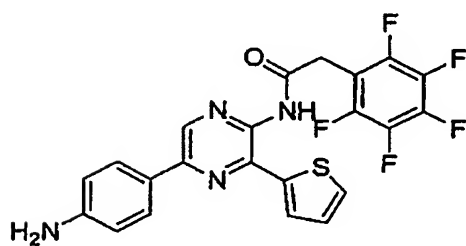
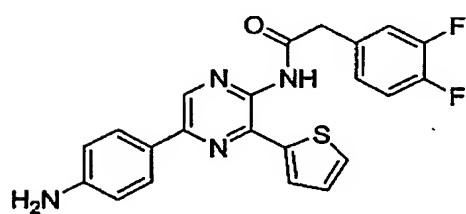
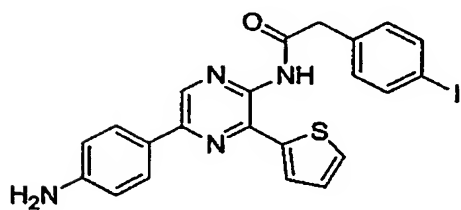
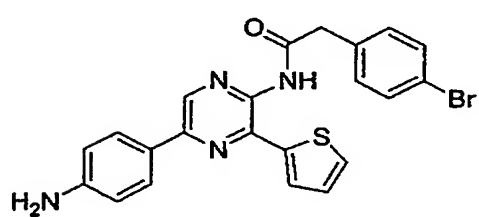
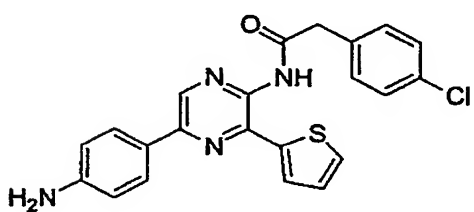
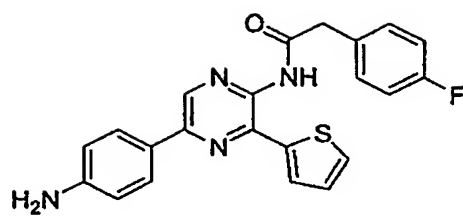
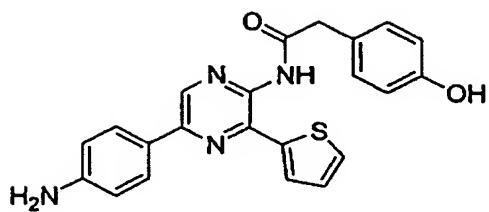
【0281】

【化182】



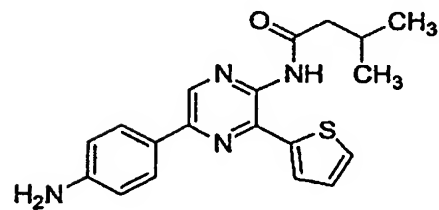
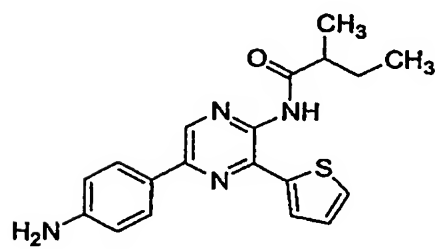
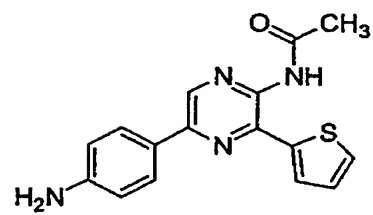
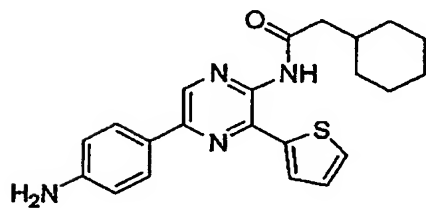
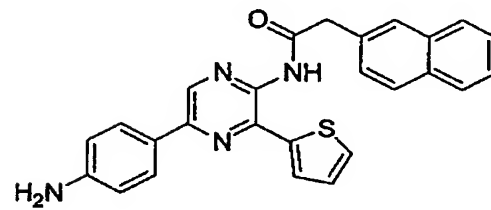
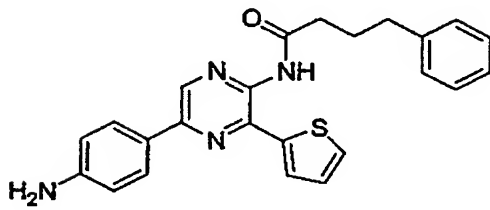
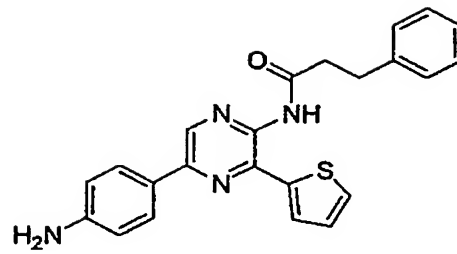
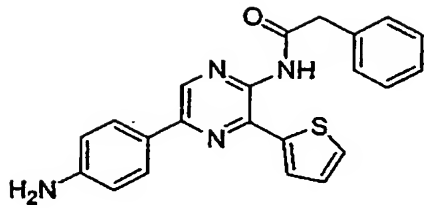
【0282】

【化 183】



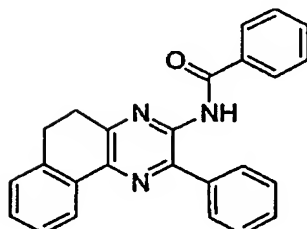
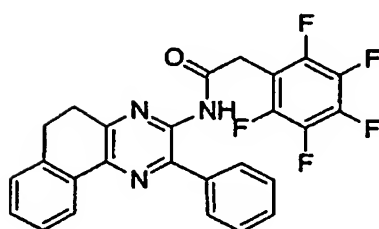
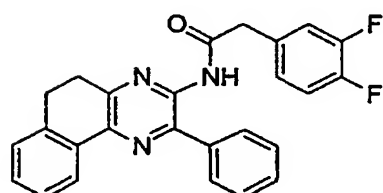
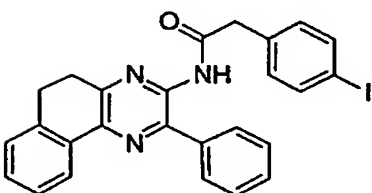
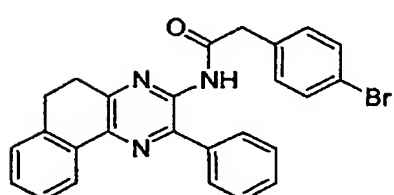
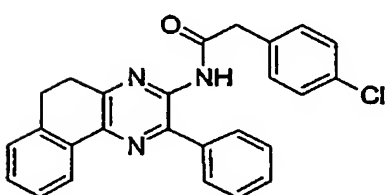
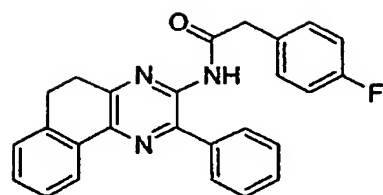
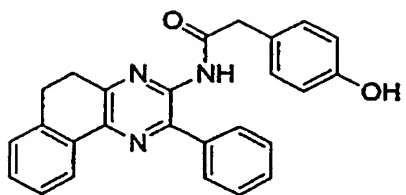
【0283】

【化 184】



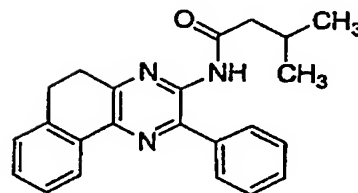
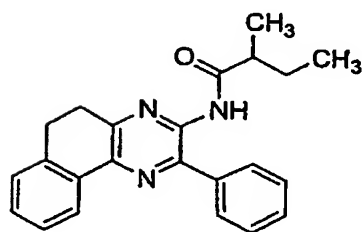
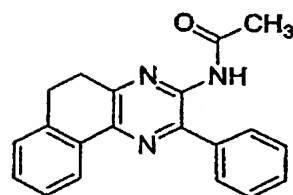
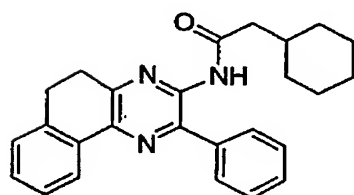
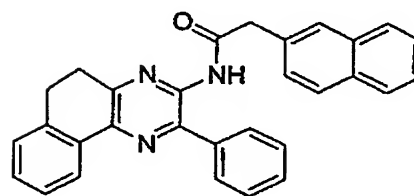
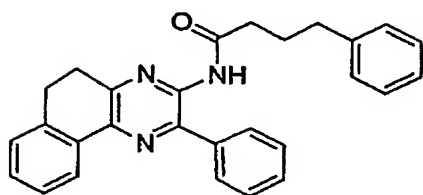
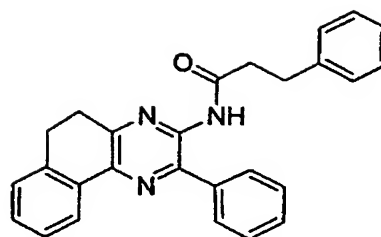
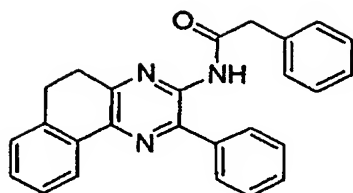
【0284】

【化185】



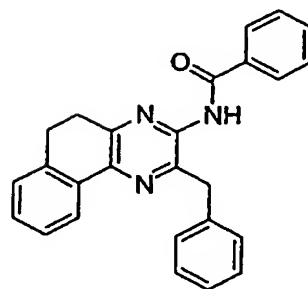
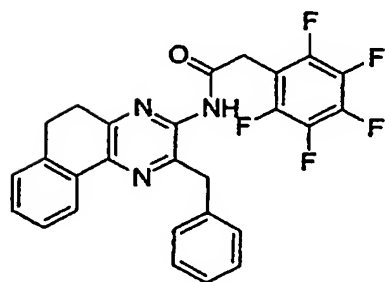
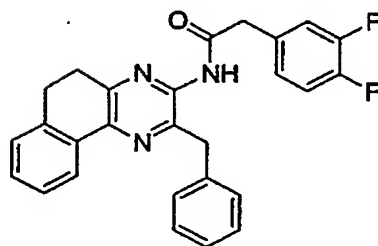
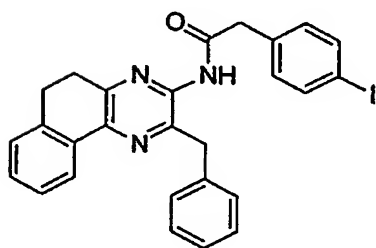
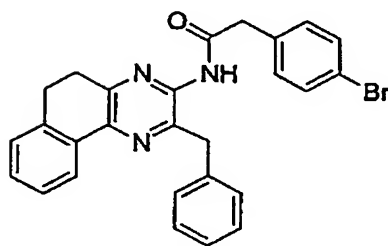
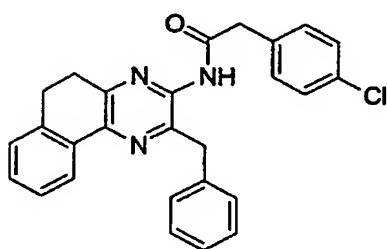
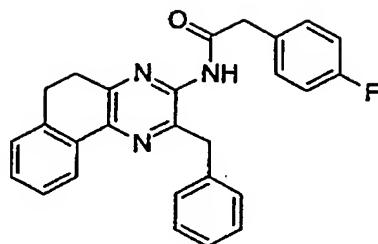
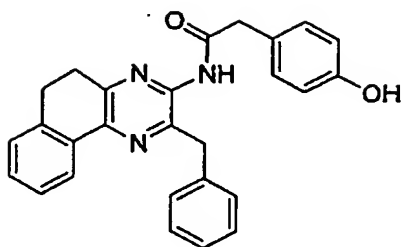
【0285】

【化186】



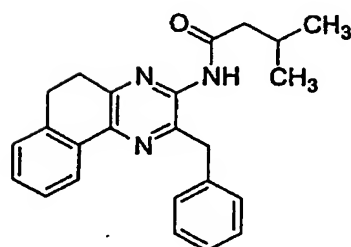
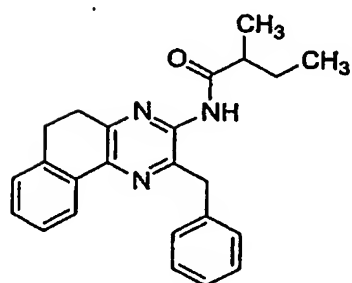
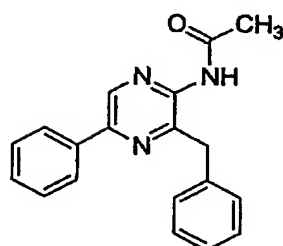
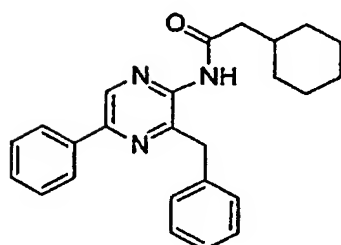
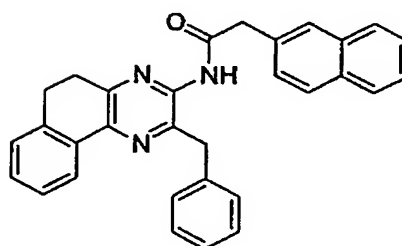
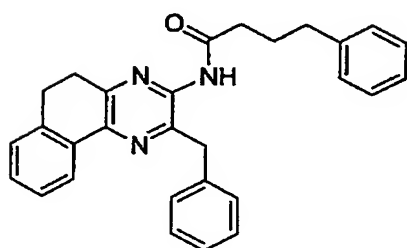
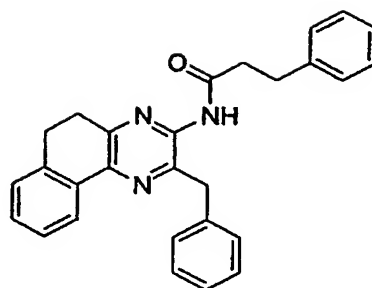
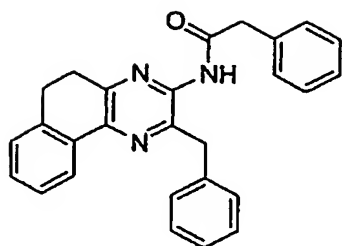
【0286】

【化187】



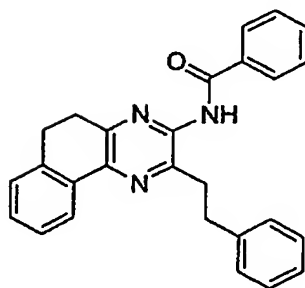
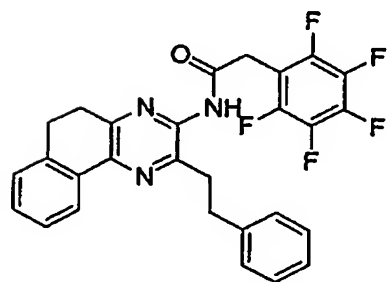
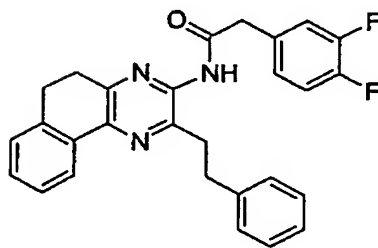
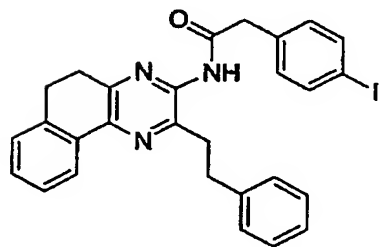
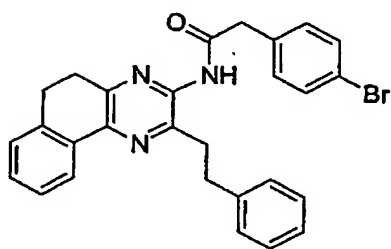
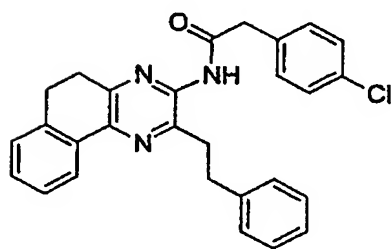
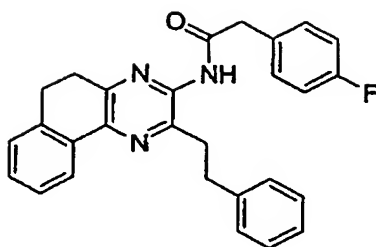
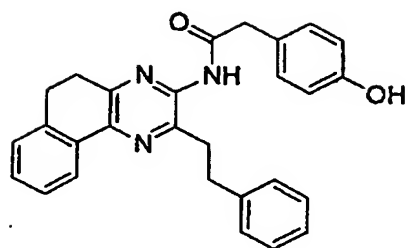
【0287】

【化188】



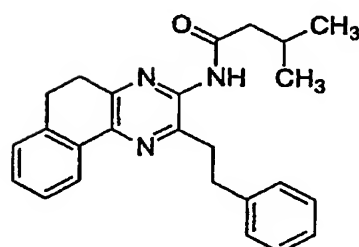
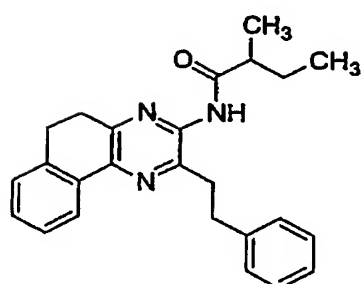
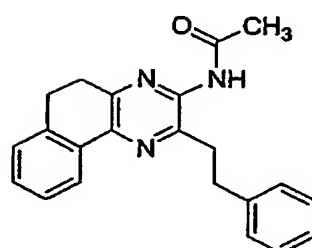
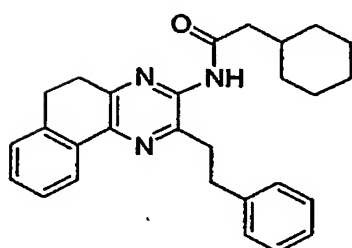
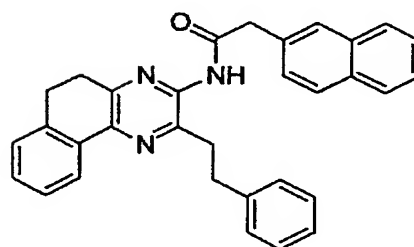
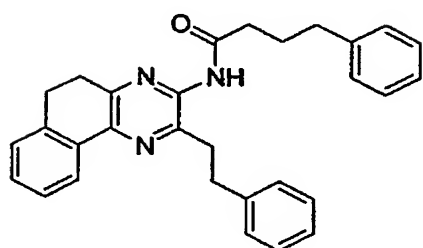
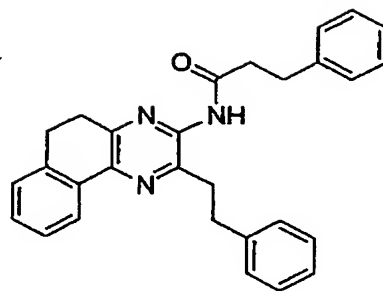
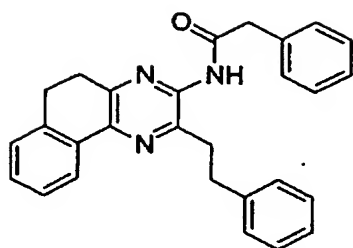
【0288】

【化 189】



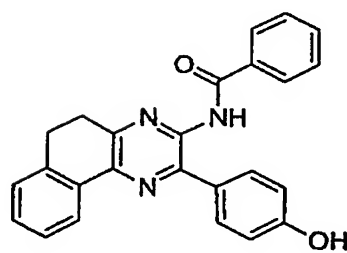
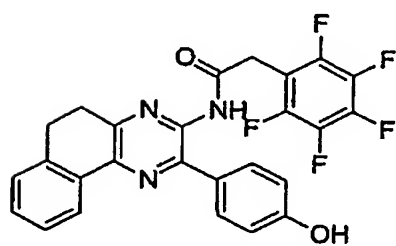
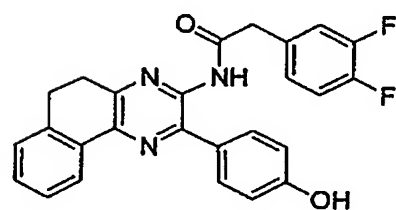
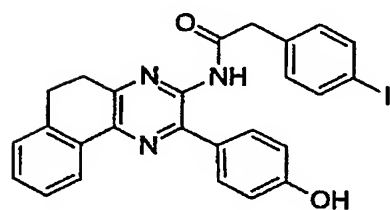
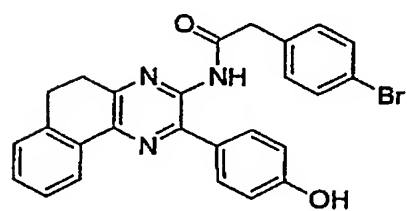
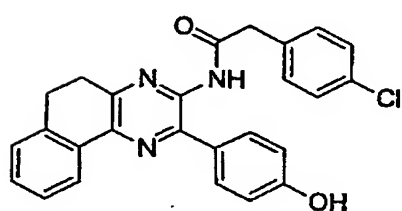
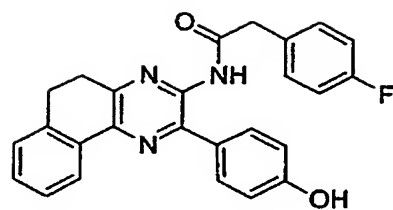
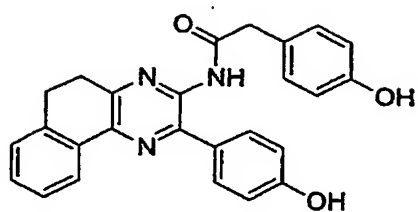
【0289】

【化190】



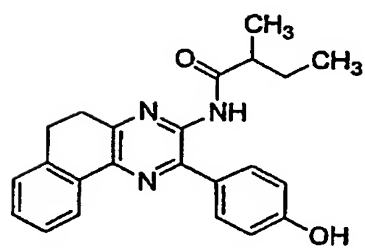
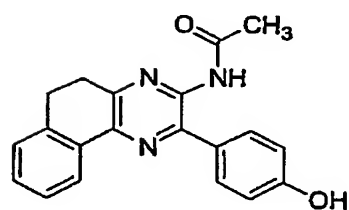
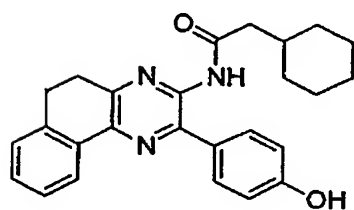
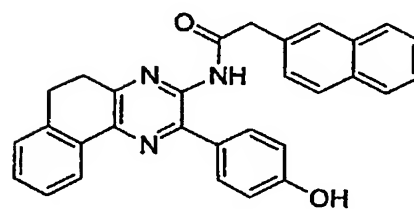
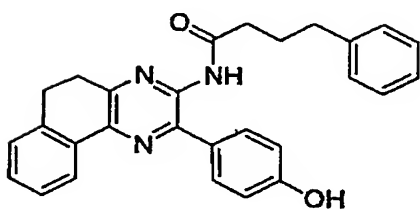
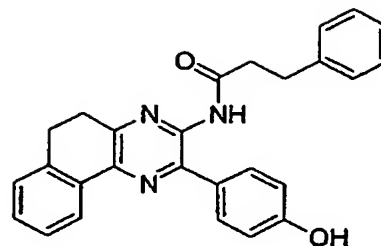
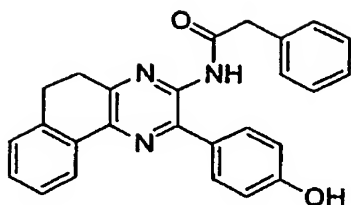
【0290】

【化191】

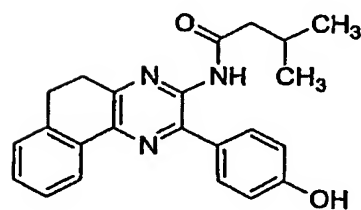


【0291】

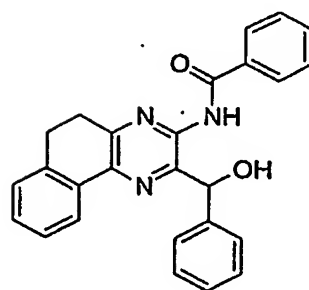
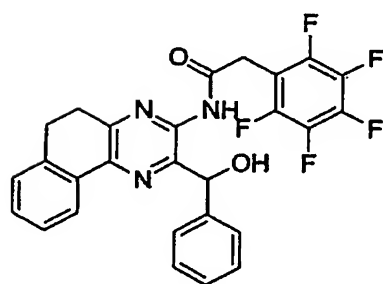
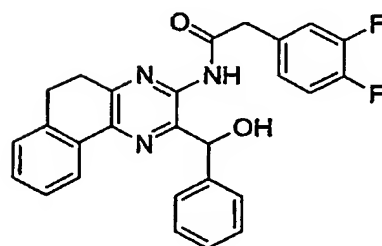
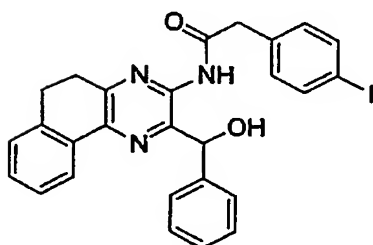
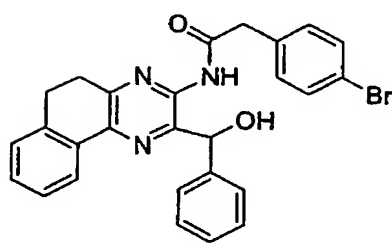
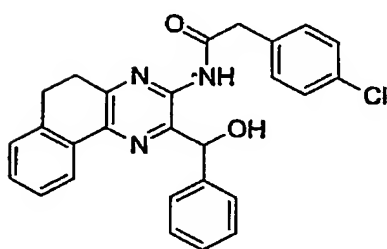
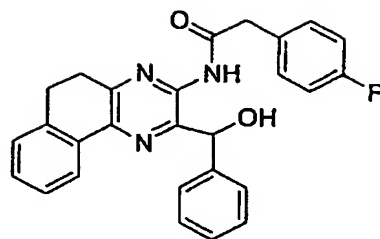
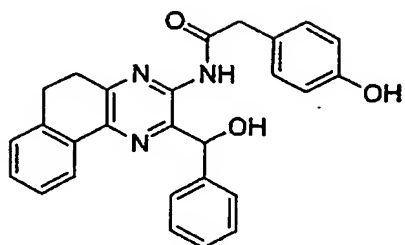
【化 192】



【0292】

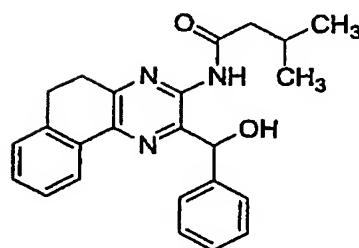
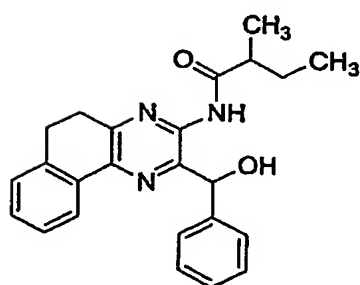
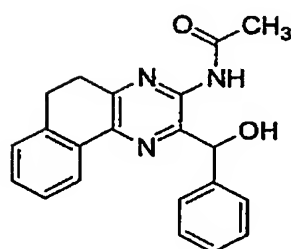
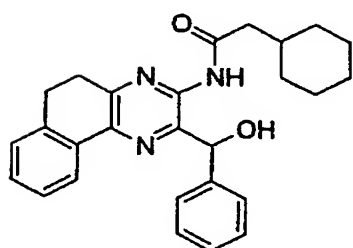
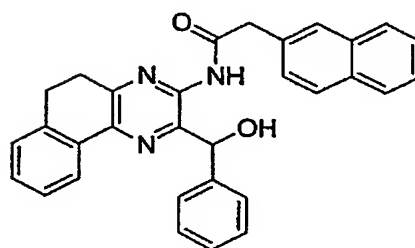
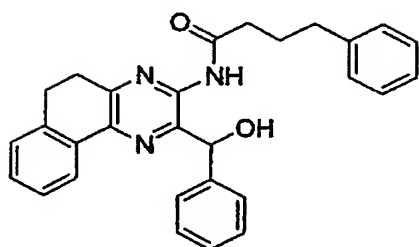
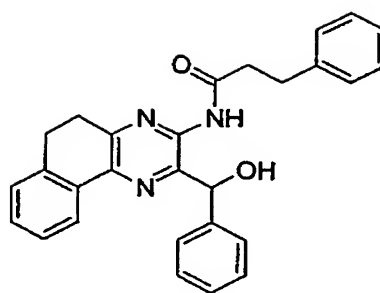
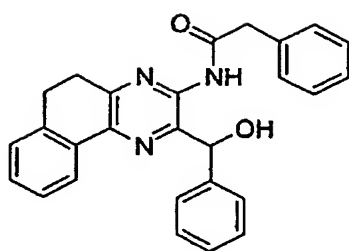


【化193】



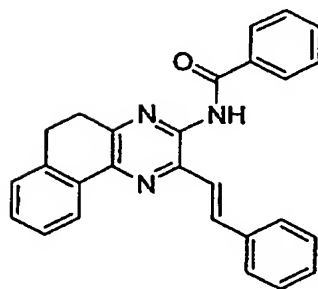
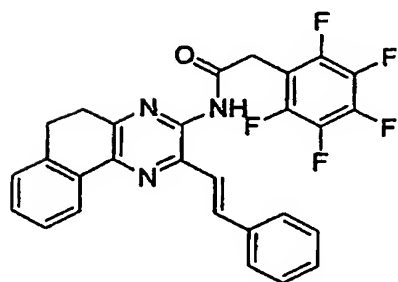
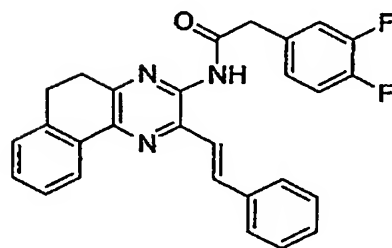
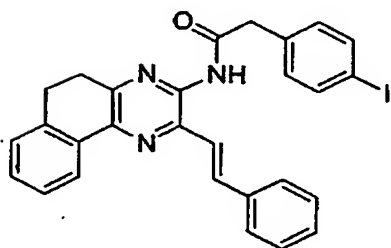
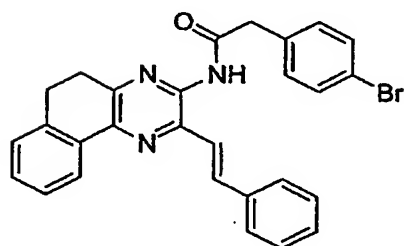
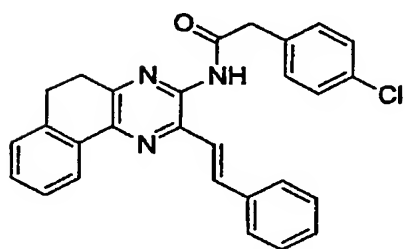
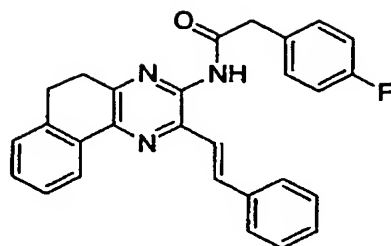
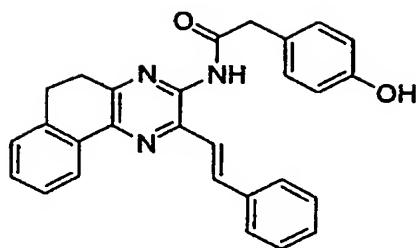
【0293】

【化 194】



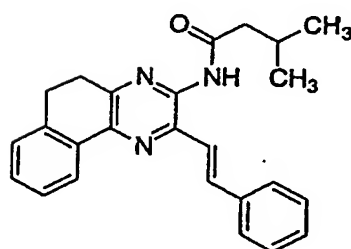
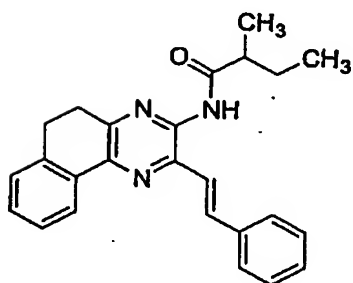
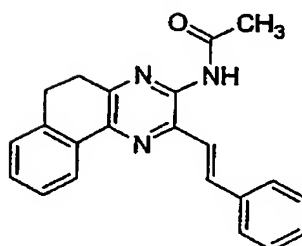
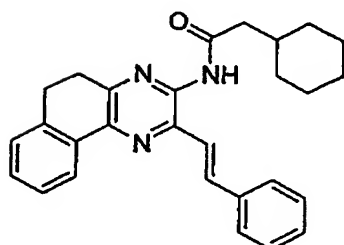
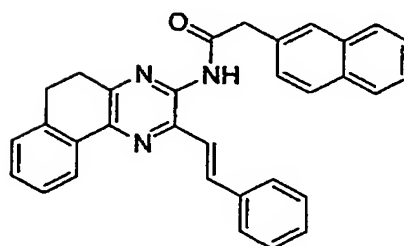
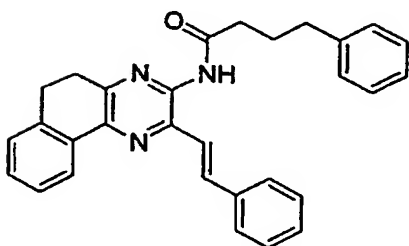
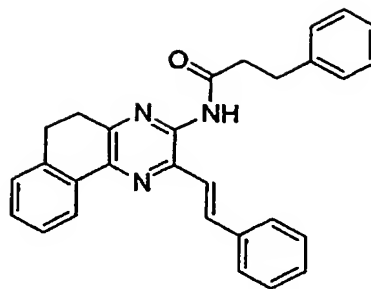
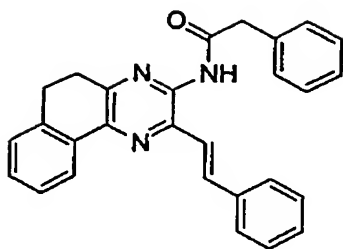
【 0 2 9 4 】

【化195】



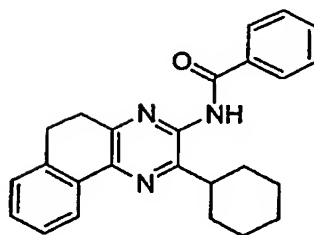
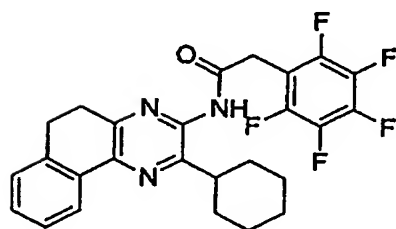
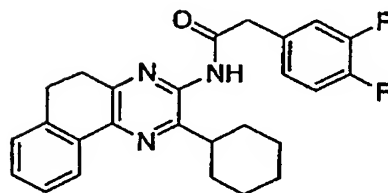
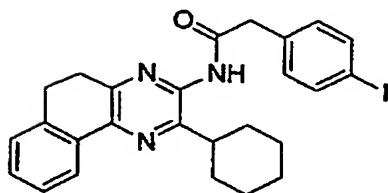
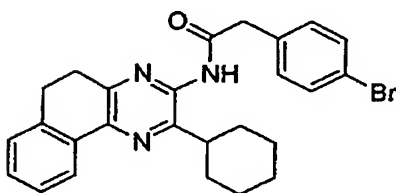
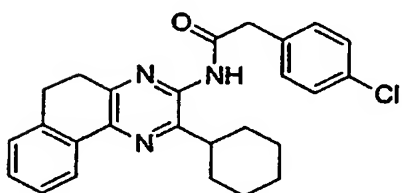
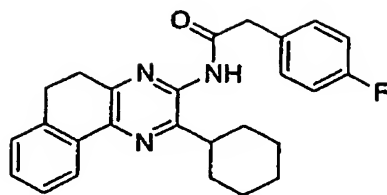
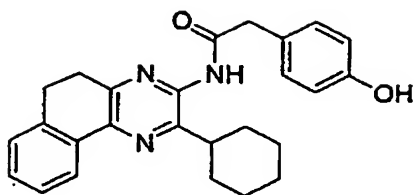
【0295】

【化196】



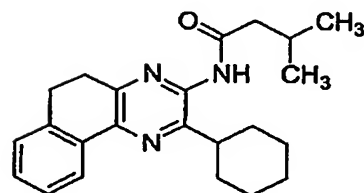
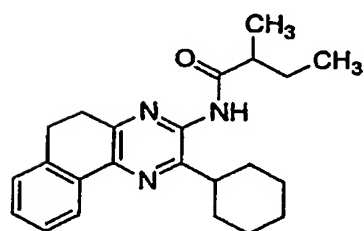
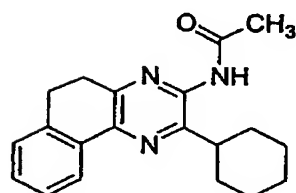
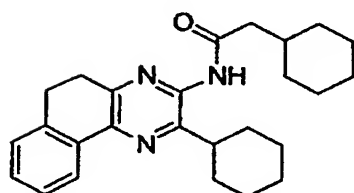
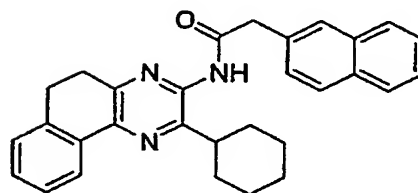
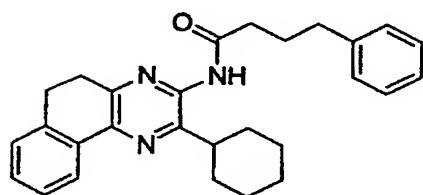
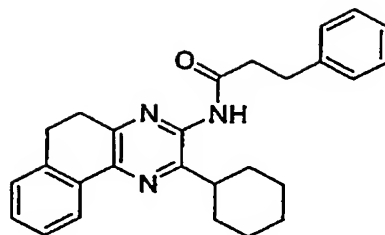
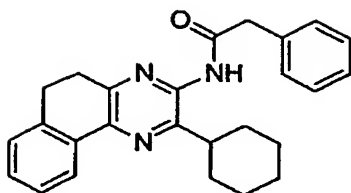
【0296】

【化197】



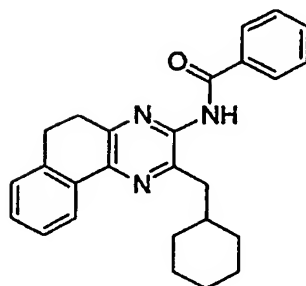
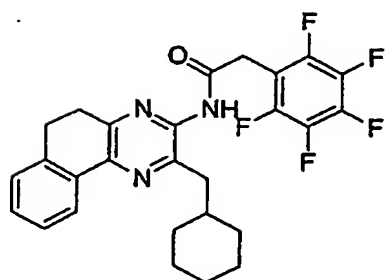
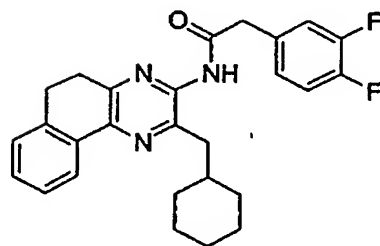
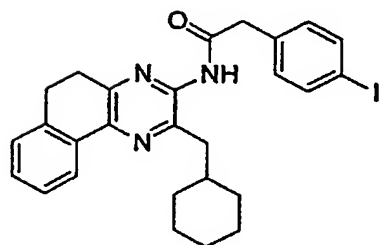
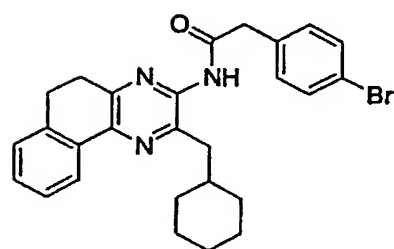
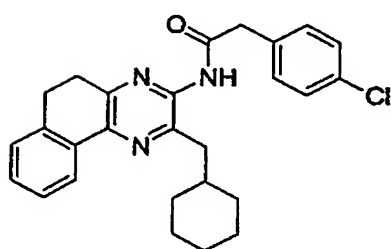
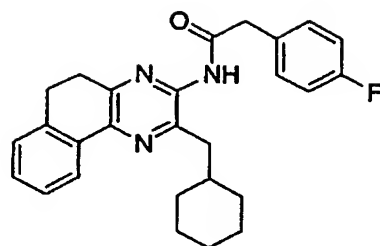
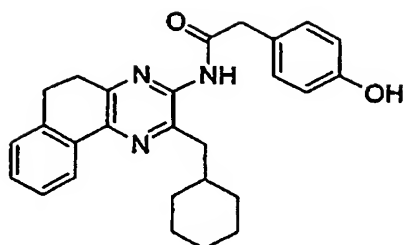
【0297】

【化 198】



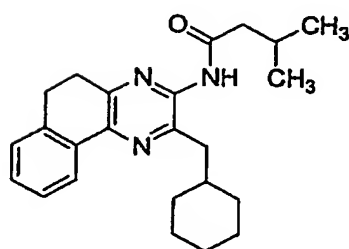
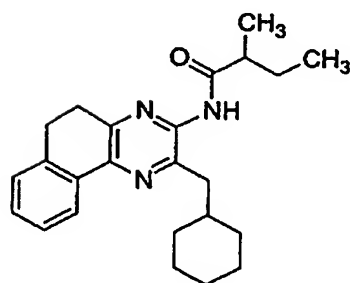
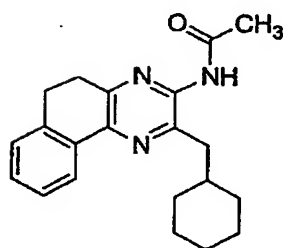
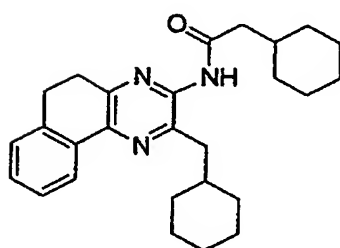
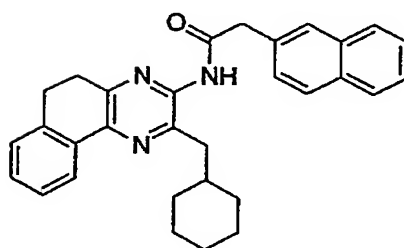
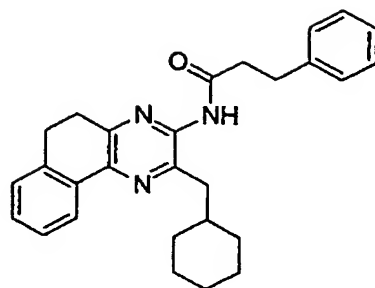
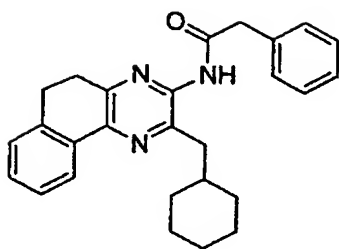
【0298】

【化 199】



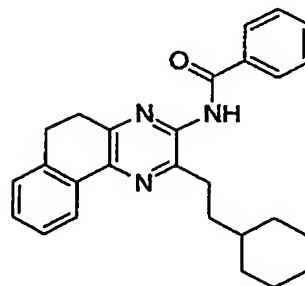
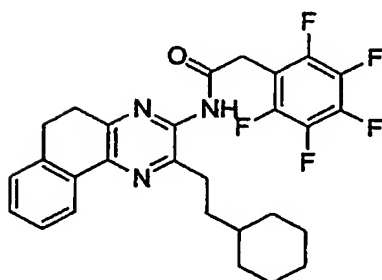
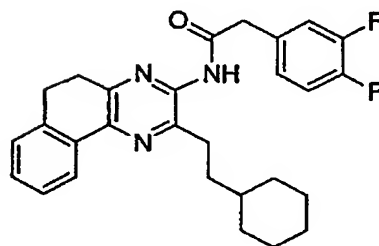
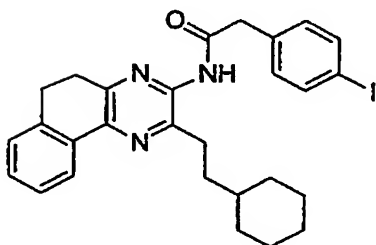
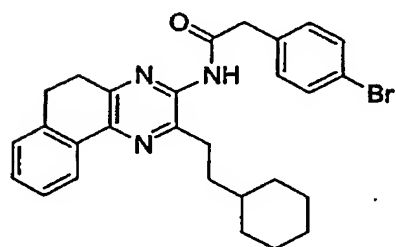
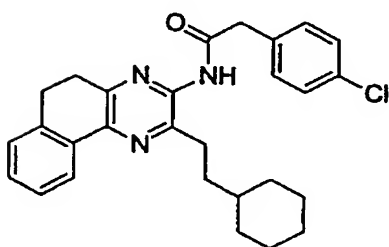
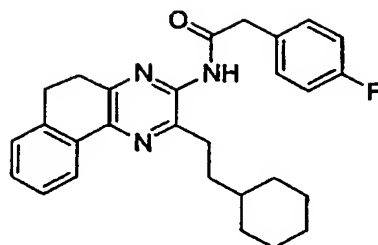
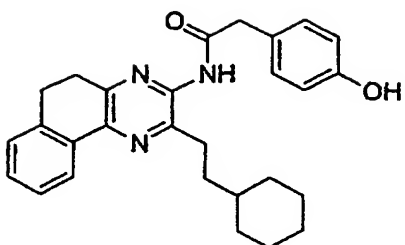
【0299】

【化200】



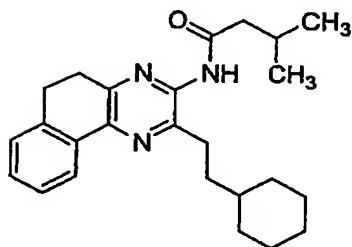
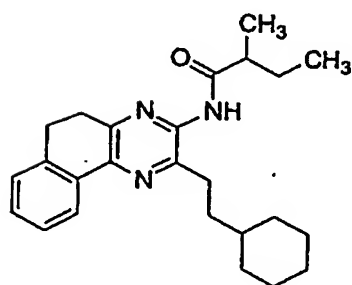
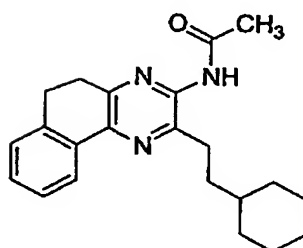
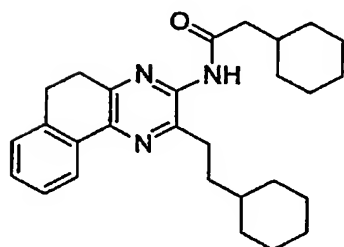
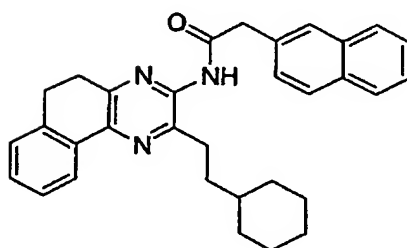
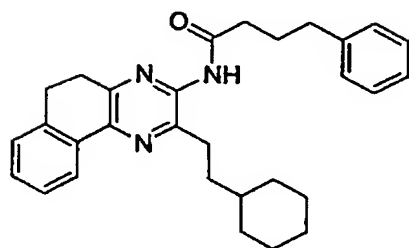
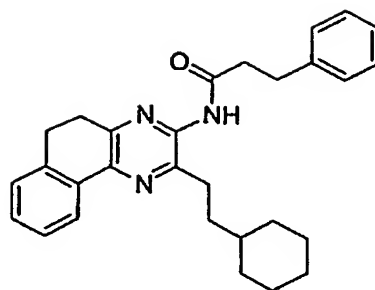
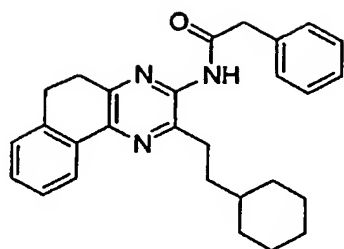
【0300】

【化 201】



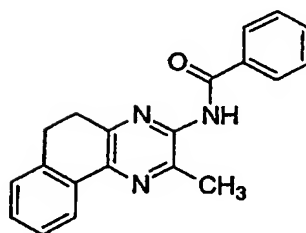
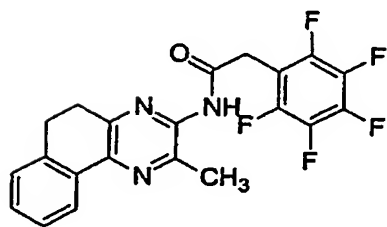
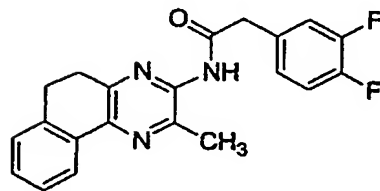
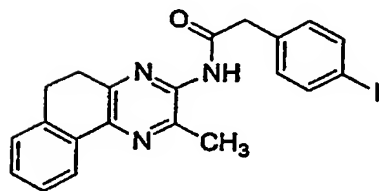
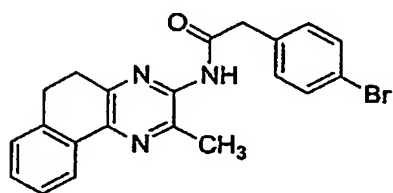
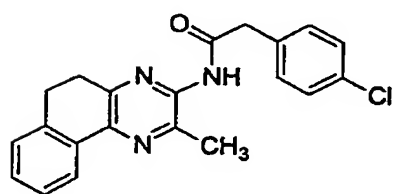
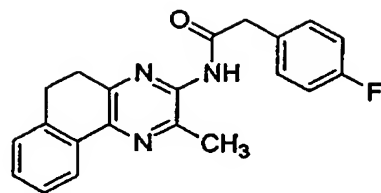
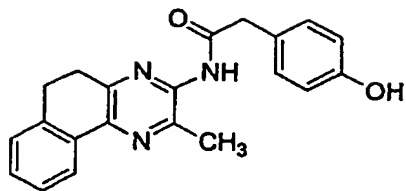
【0301】

【化 202】



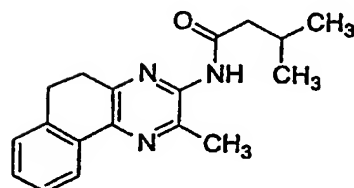
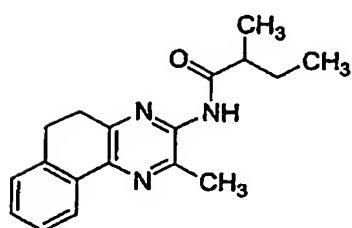
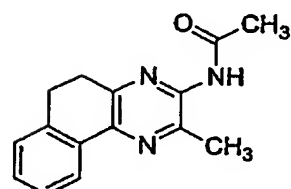
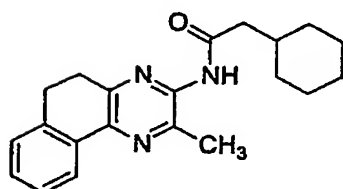
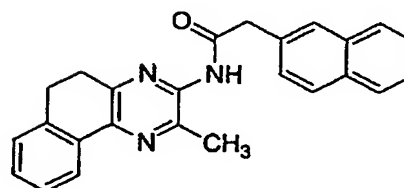
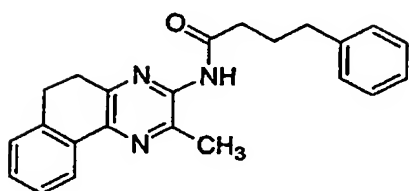
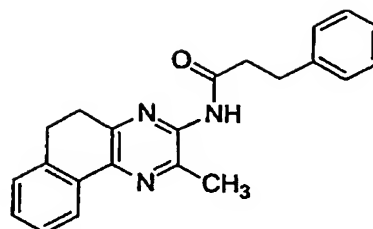
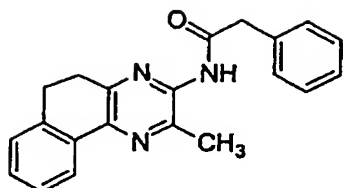
【0302】

【化 203】



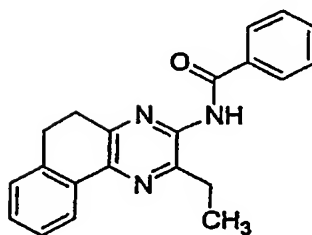
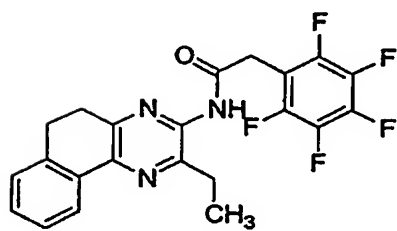
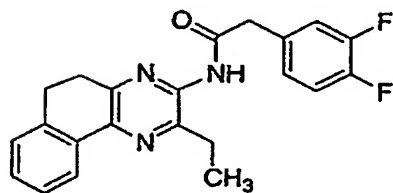
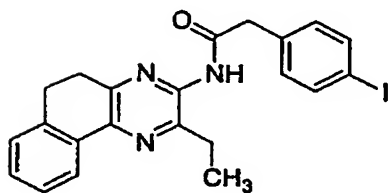
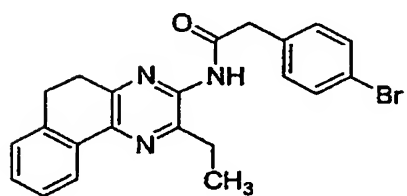
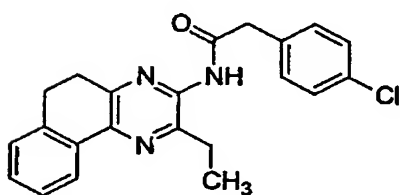
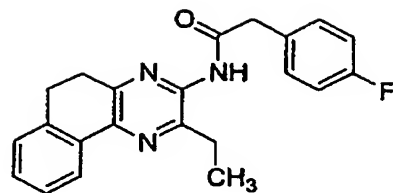
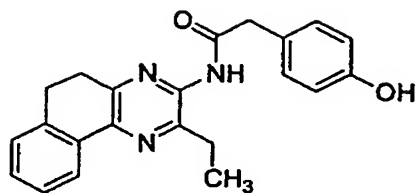
【0303】

【化 204】



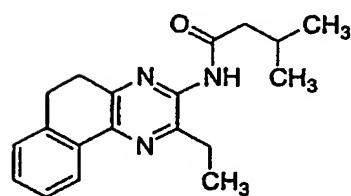
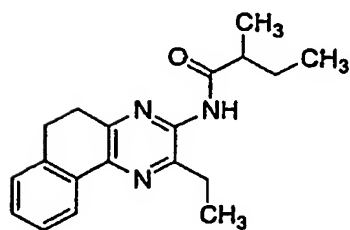
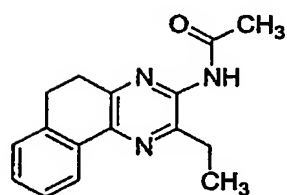
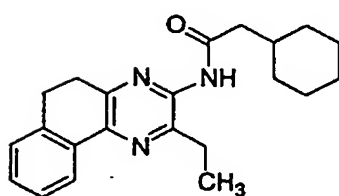
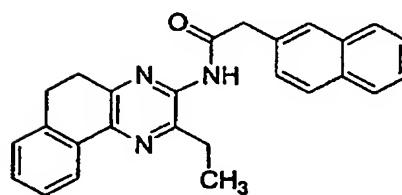
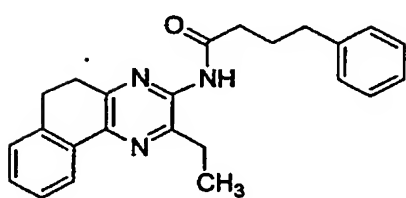
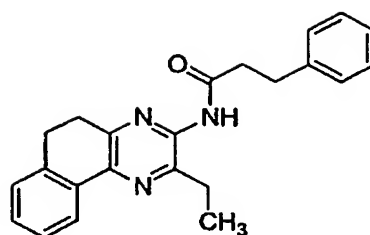
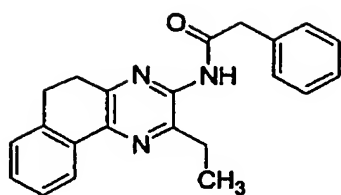
【0304】

【化 205】



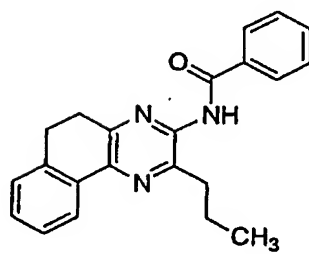
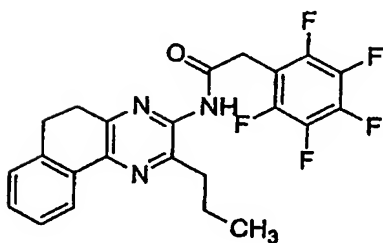
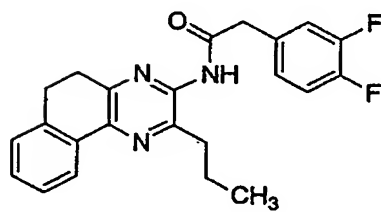
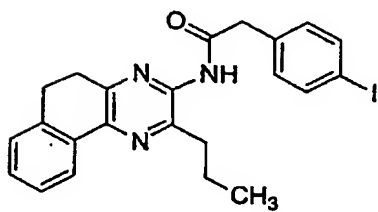
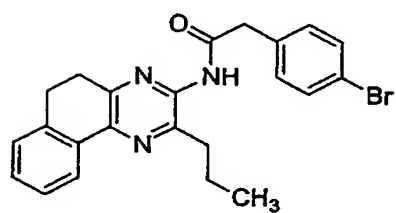
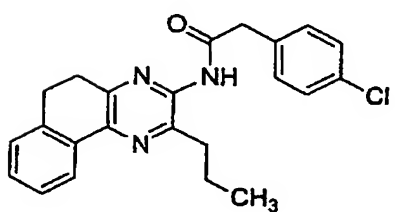
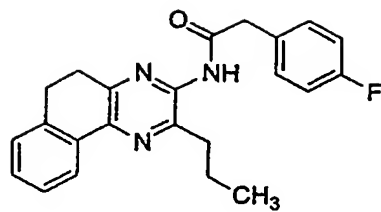
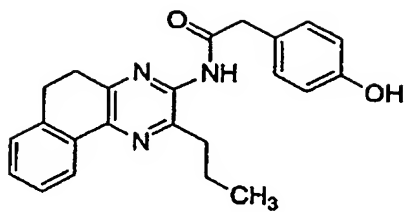
【0305】

【化 206】



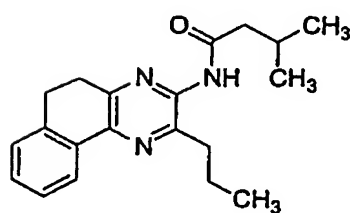
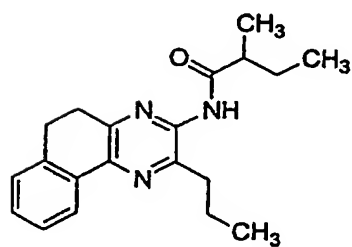
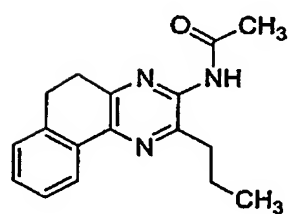
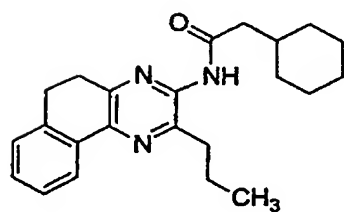
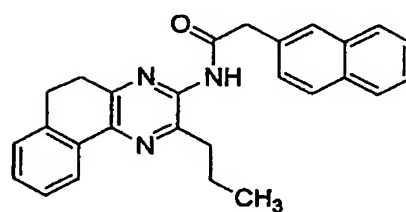
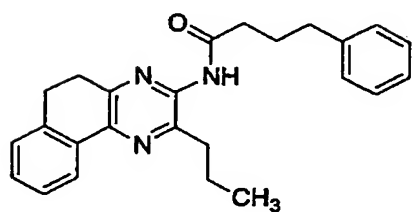
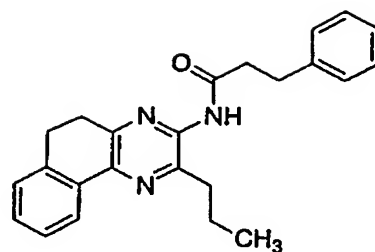
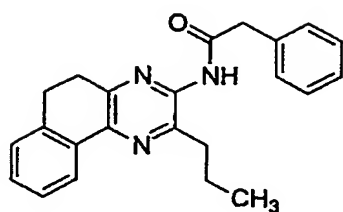
【0306】

【化 207】



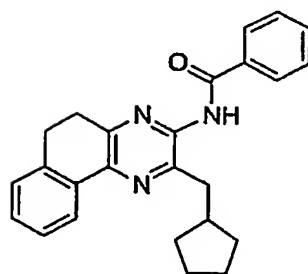
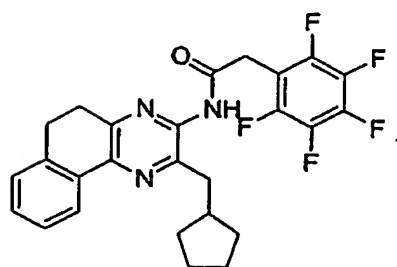
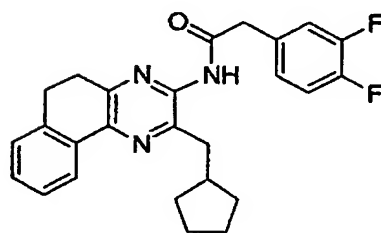
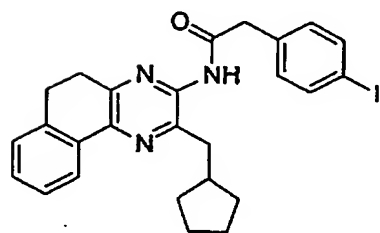
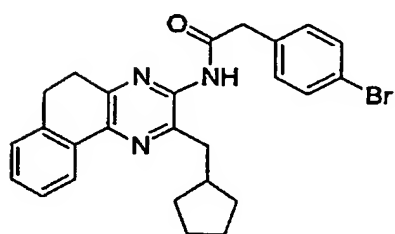
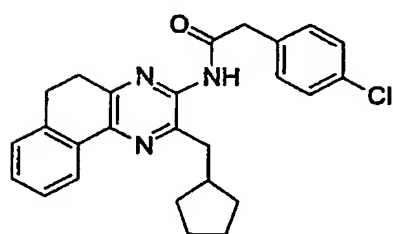
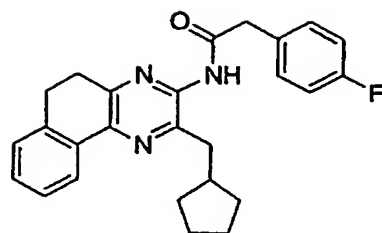
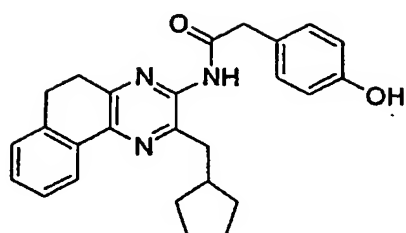
【0307】

【化 208】



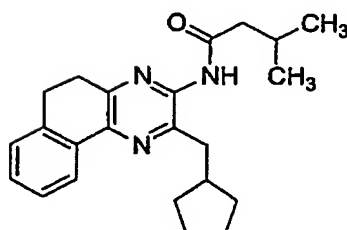
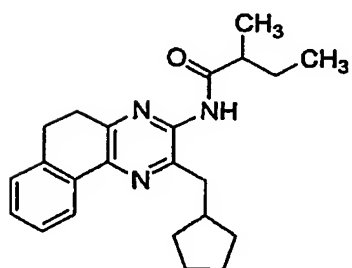
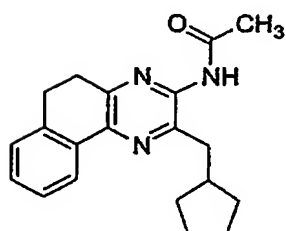
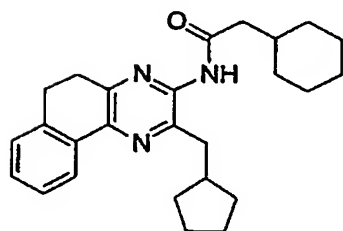
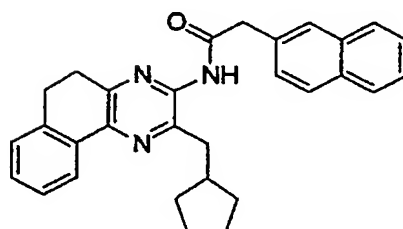
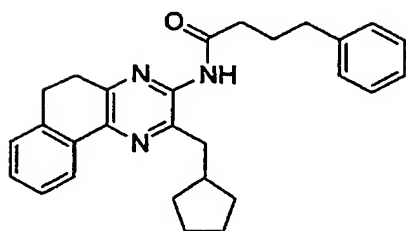
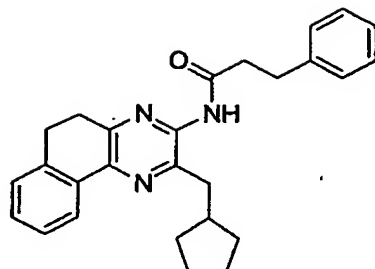
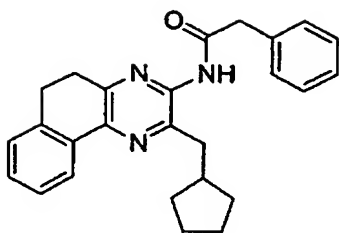
【0308】

【化 209】



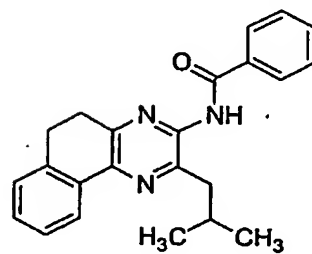
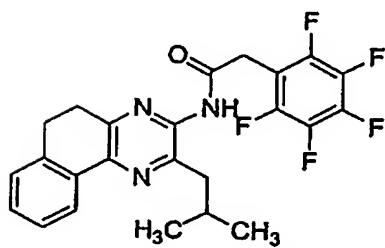
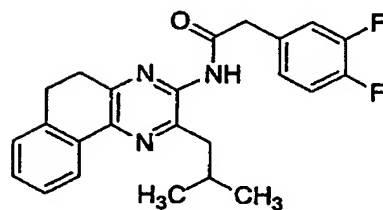
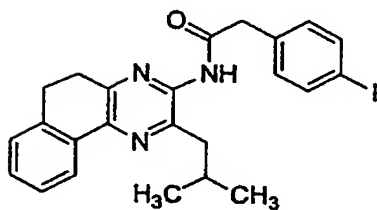
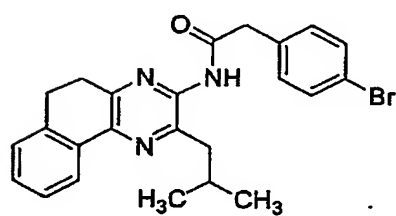
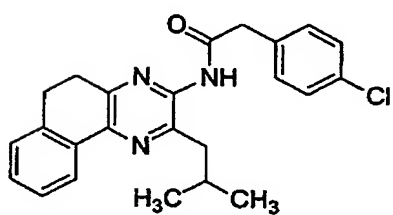
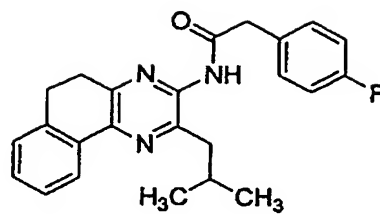
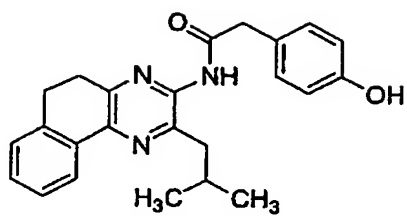
【0309】

【化 210】



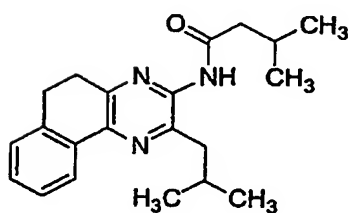
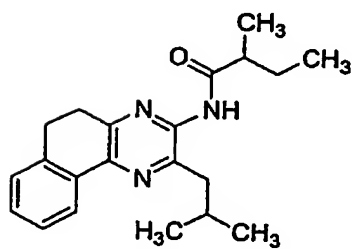
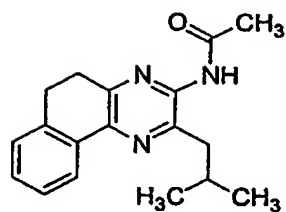
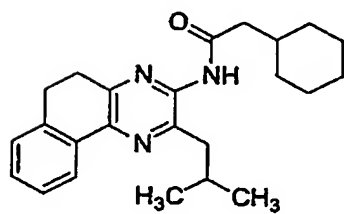
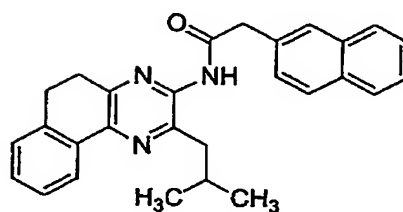
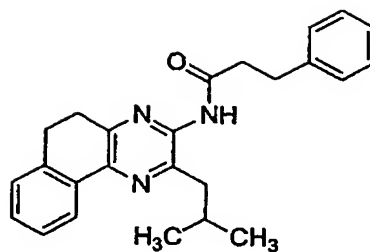
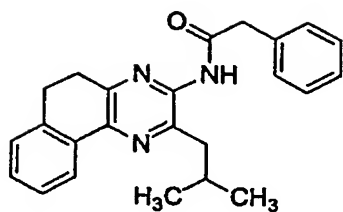
【0310】

【化 211】



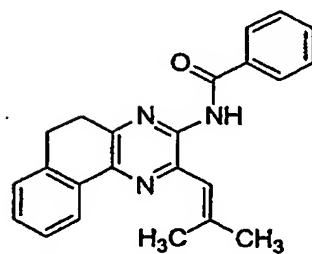
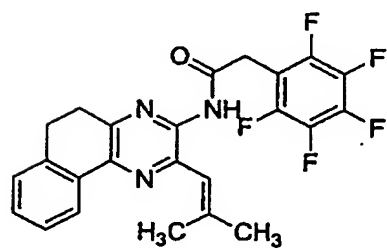
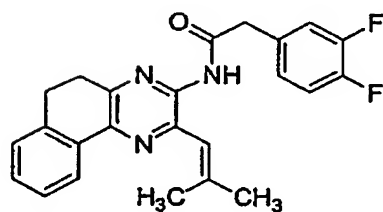
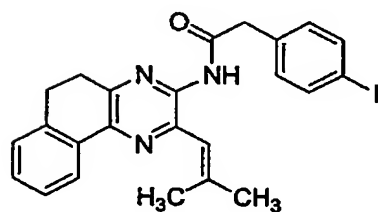
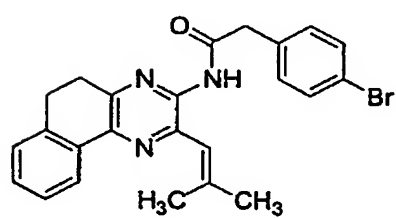
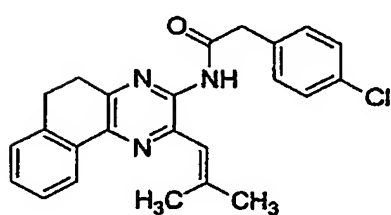
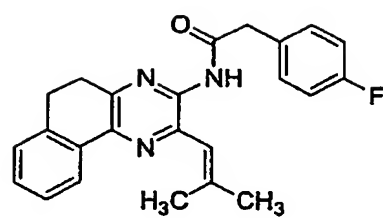
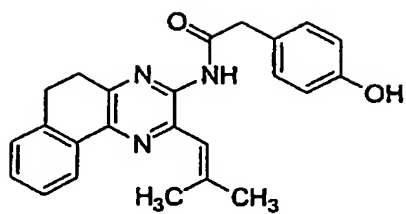
【0311】

【化 2 1 2】



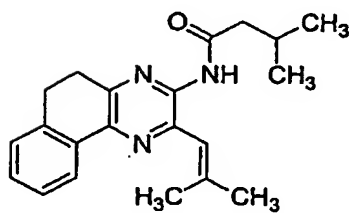
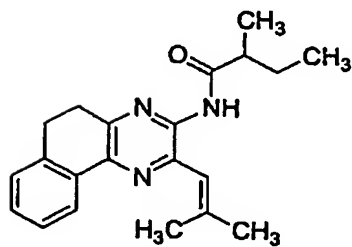
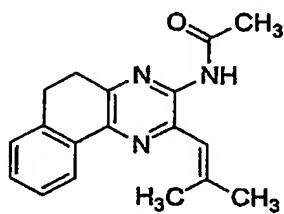
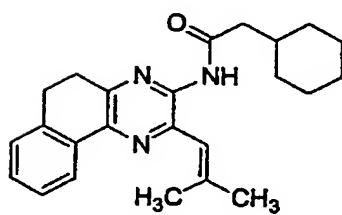
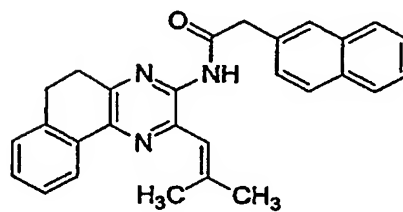
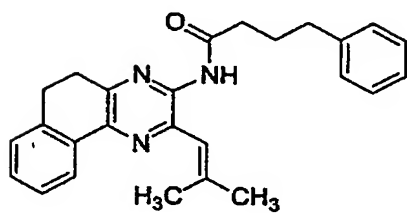
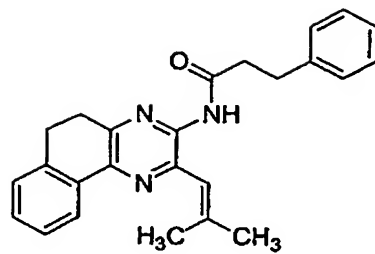
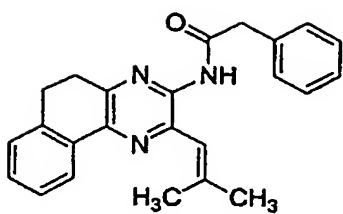
【 0 3 1 2】

【化 2 1 3】



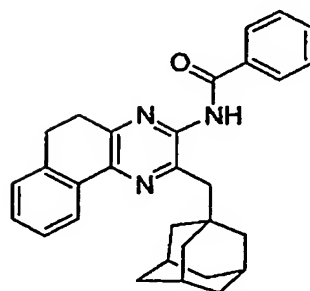
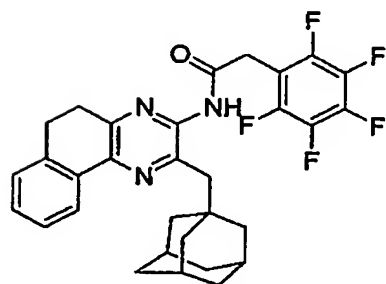
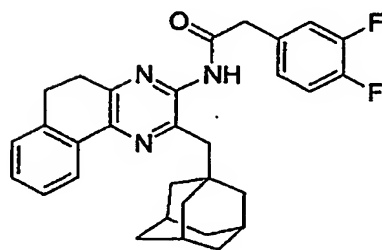
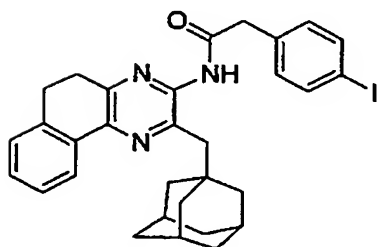
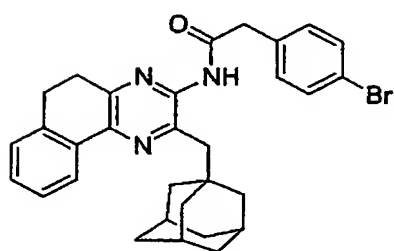
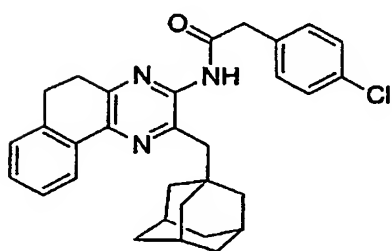
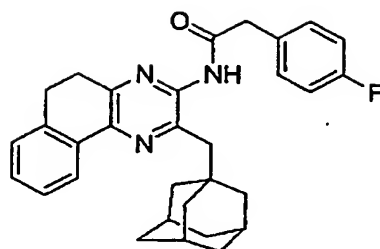
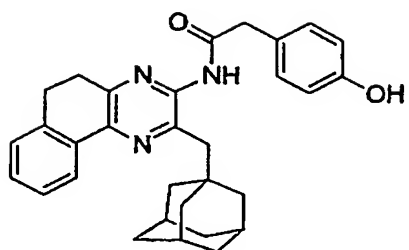
【0 3 1 3】

【化 214】



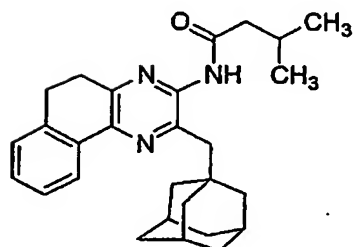
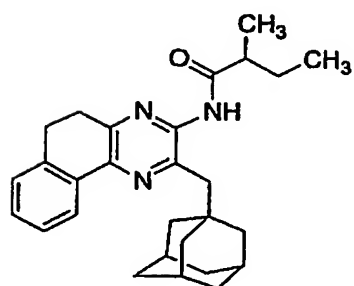
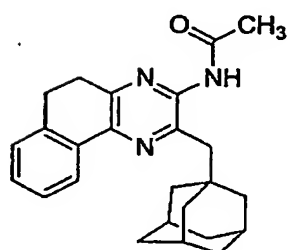
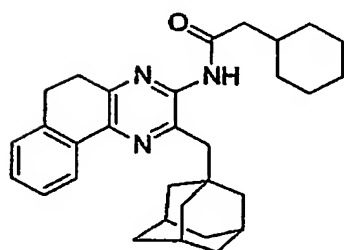
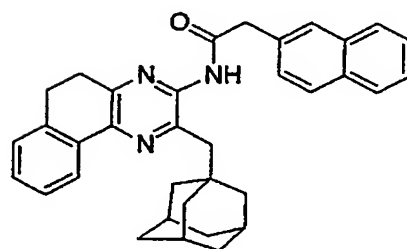
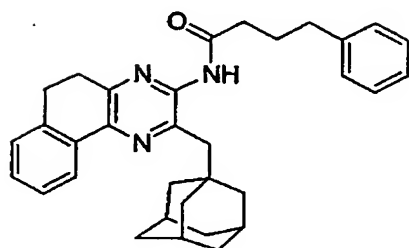
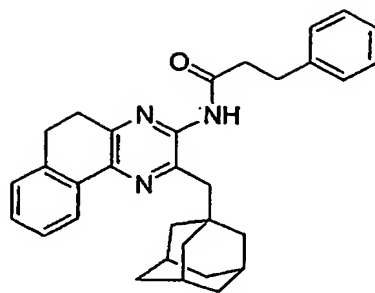
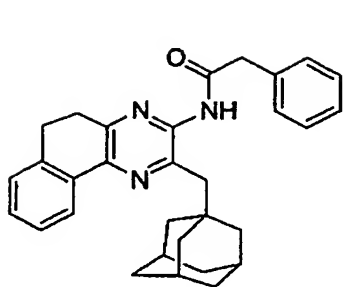
【0314】

【化 215】



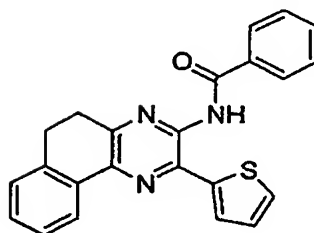
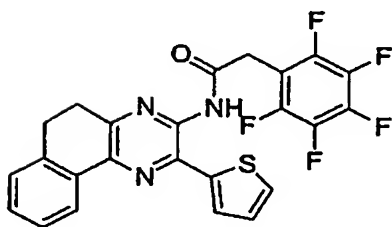
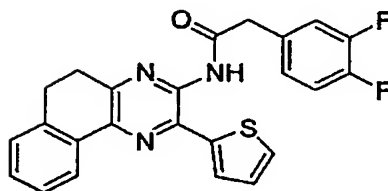
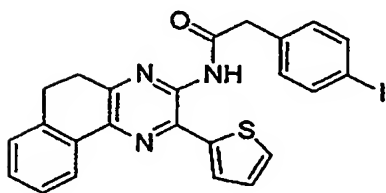
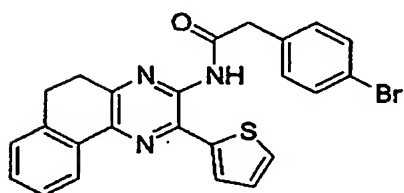
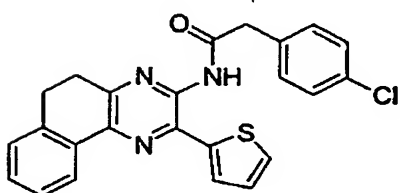
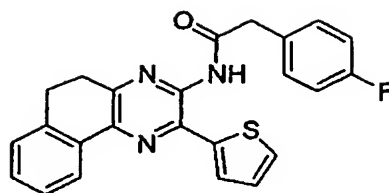
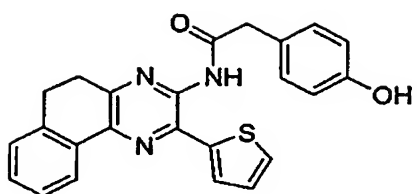
【0315】

【化 216】



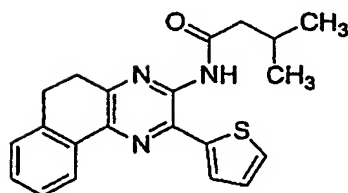
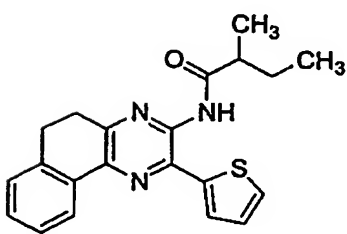
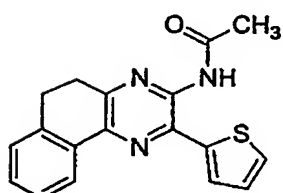
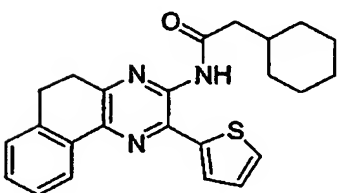
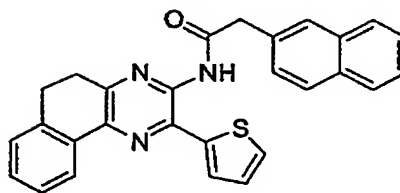
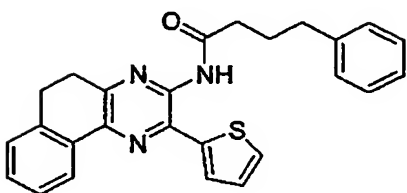
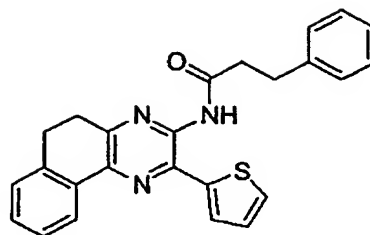
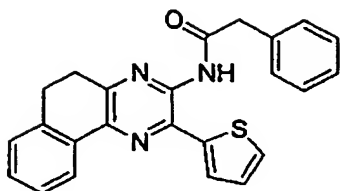
【0316】

【化 217】



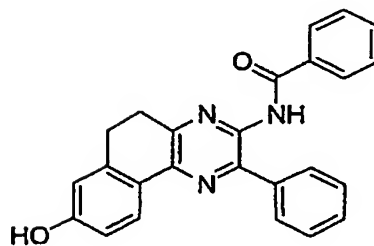
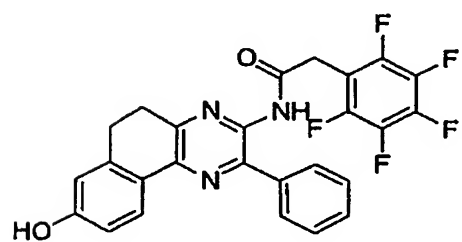
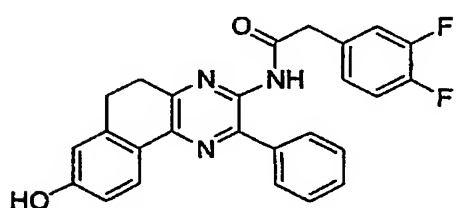
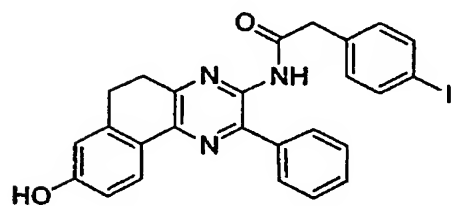
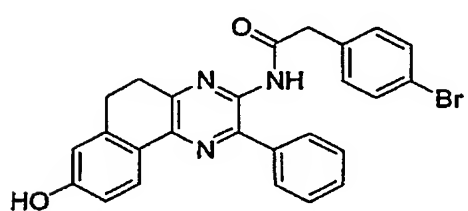
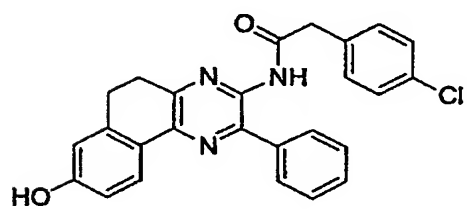
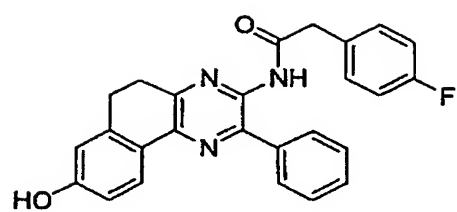
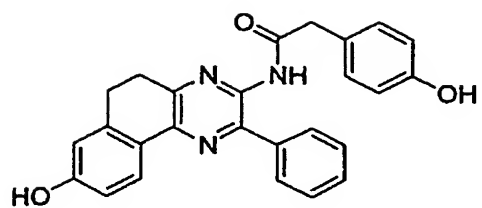
【0317】

【化 218】



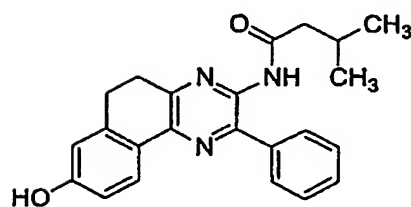
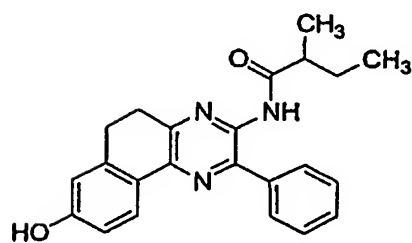
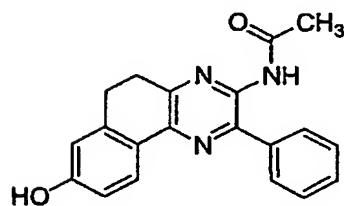
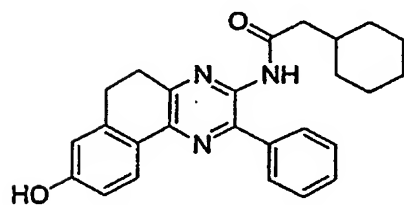
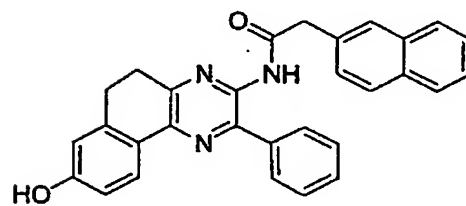
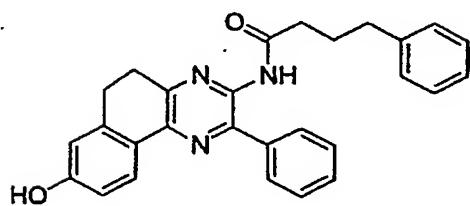
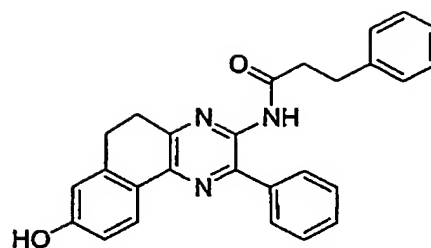
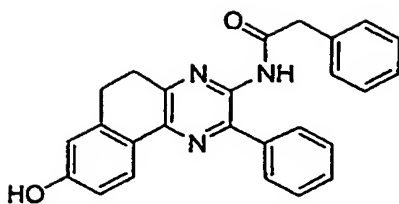
【0318】

【化 219】



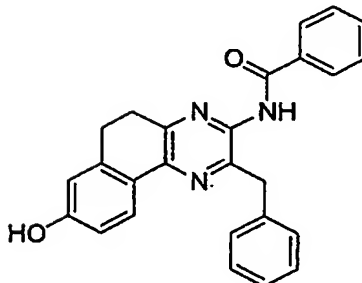
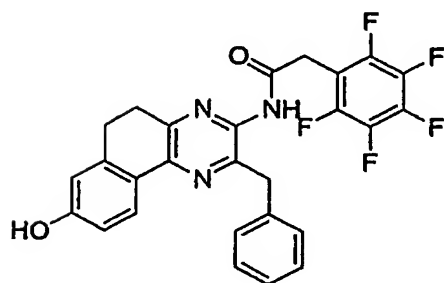
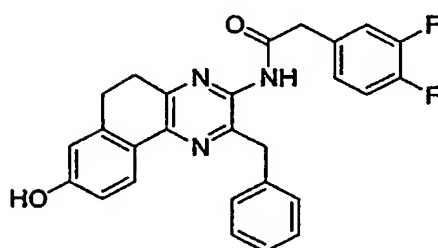
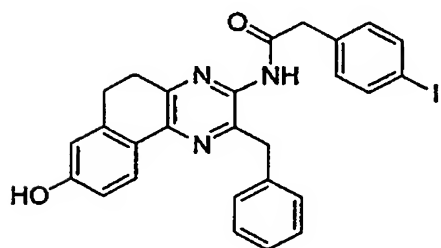
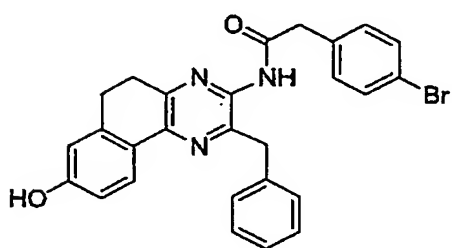
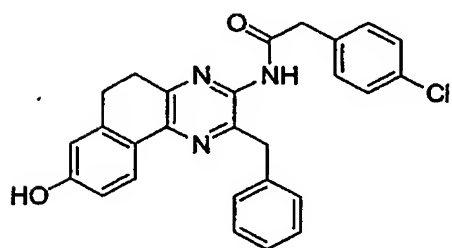
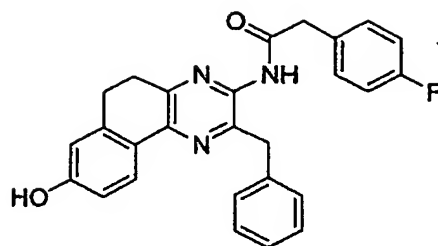
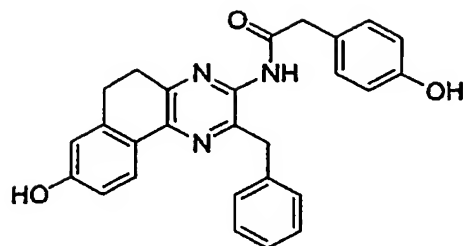
【0319】

【化 220】



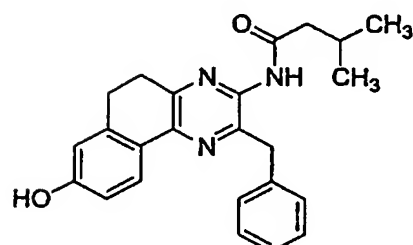
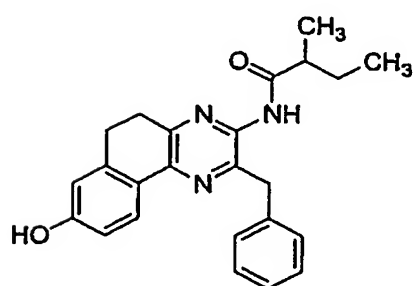
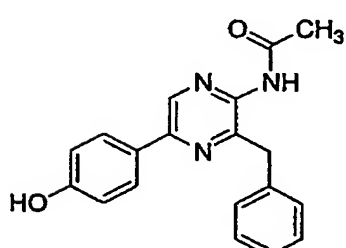
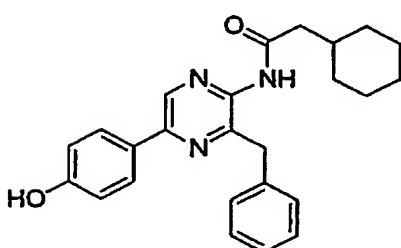
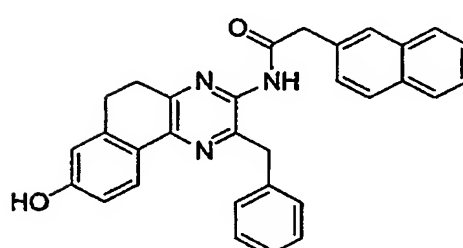
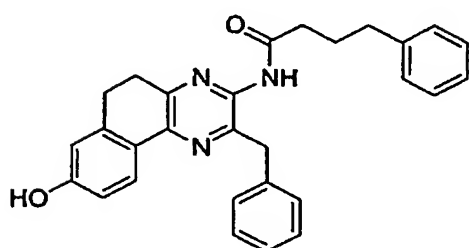
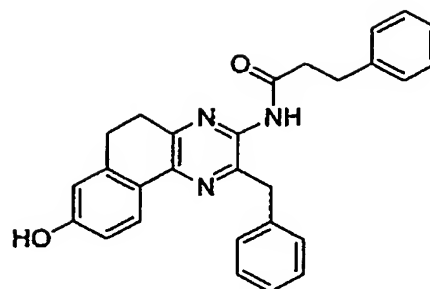
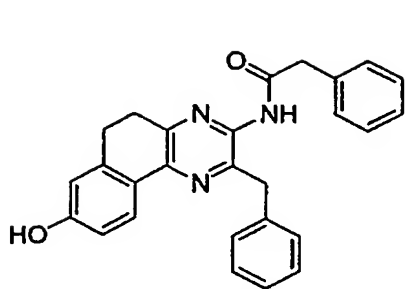
【0320】

【化 2 2 1】



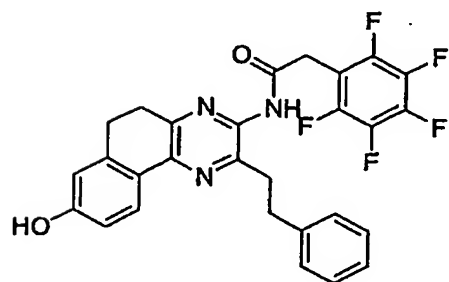
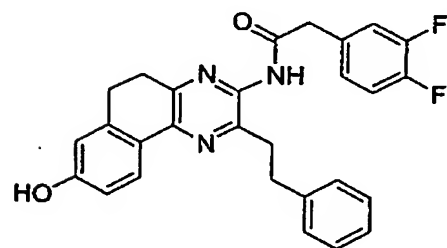
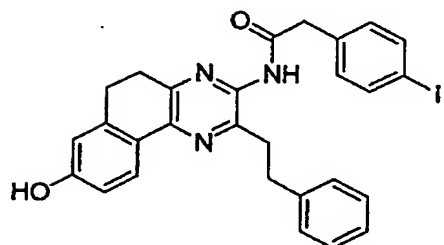
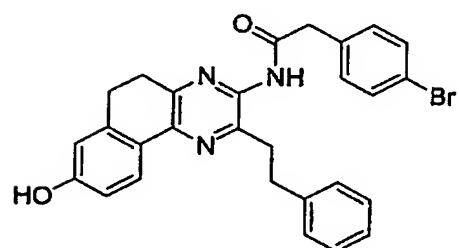
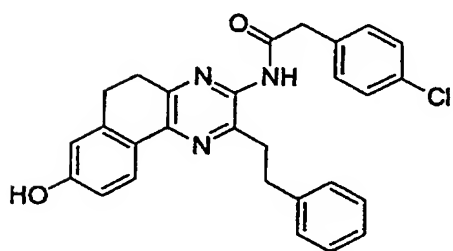
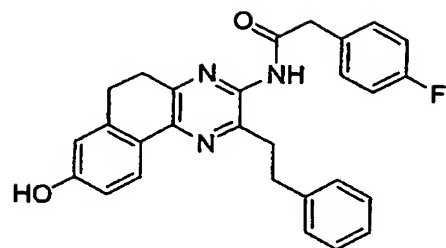
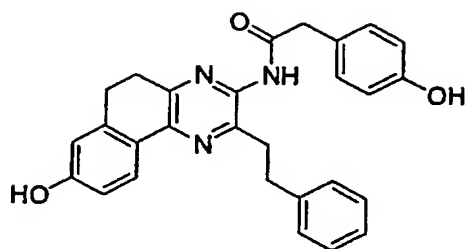
【0 3 2 1】

【化 2 2 2】

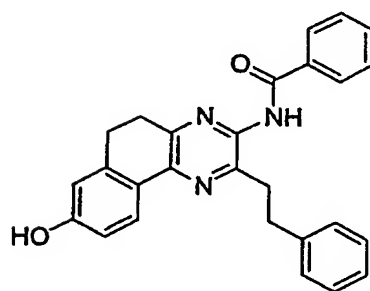


【0 3 2 2】

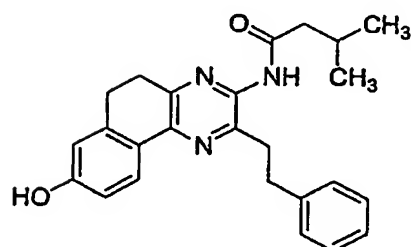
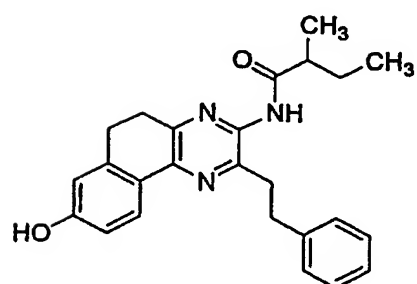
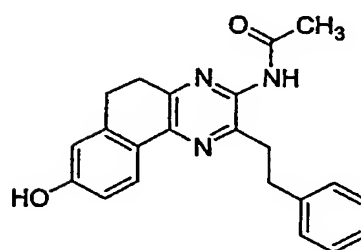
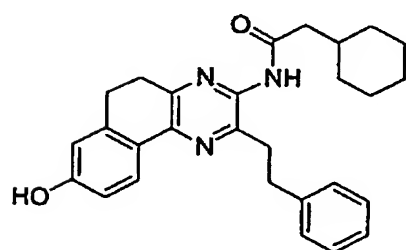
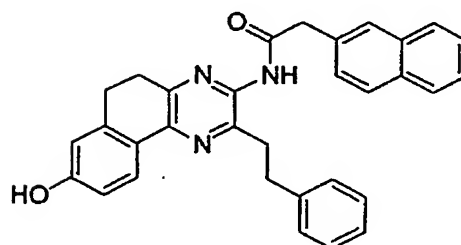
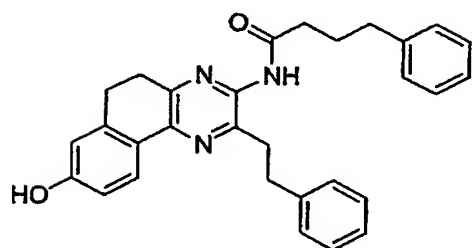
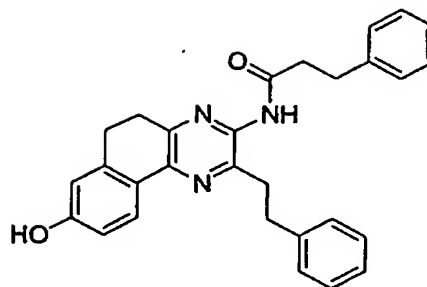
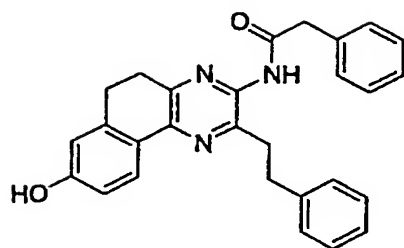
【化 2 2 3】



【0 3 2 3】

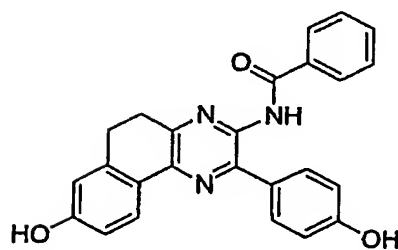
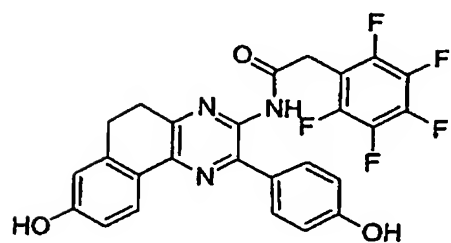
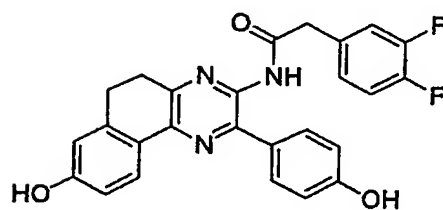
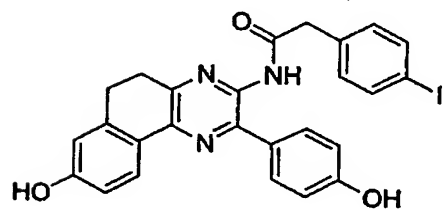
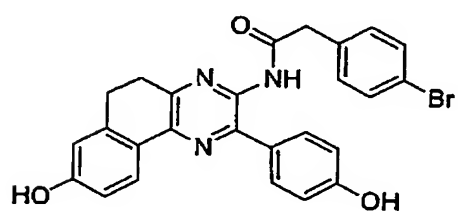
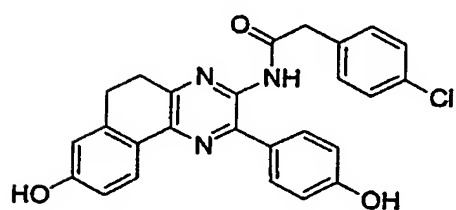
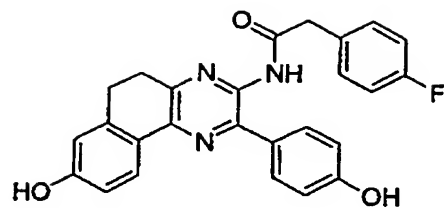
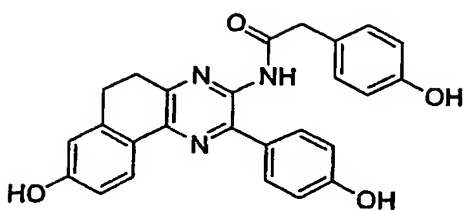


【化 2 2 4】



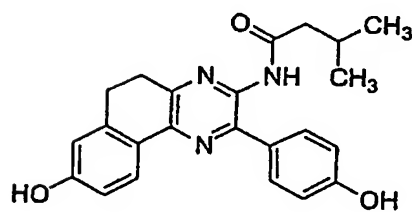
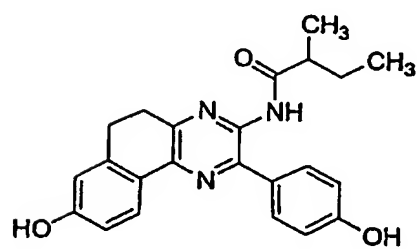
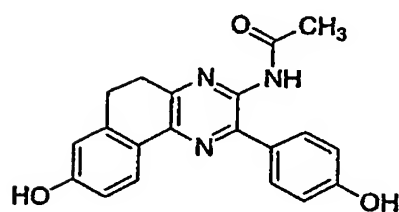
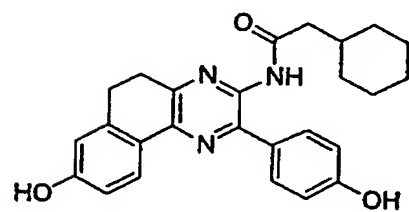
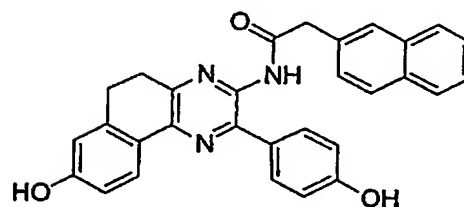
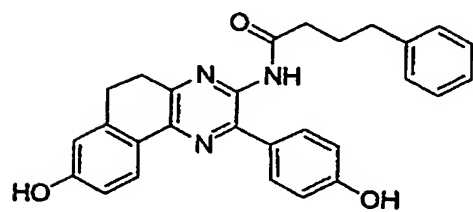
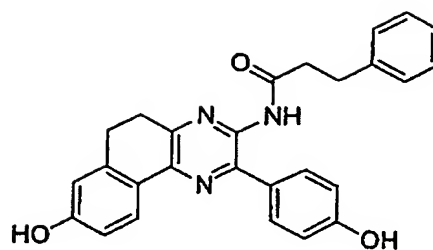
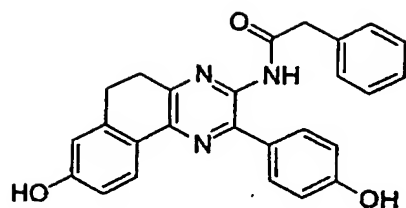
【 0 3 2 4】

【化 225】



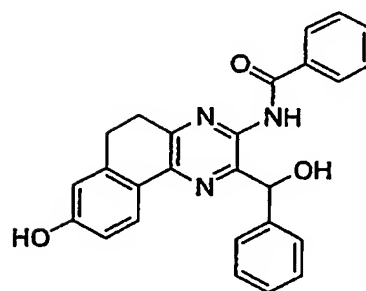
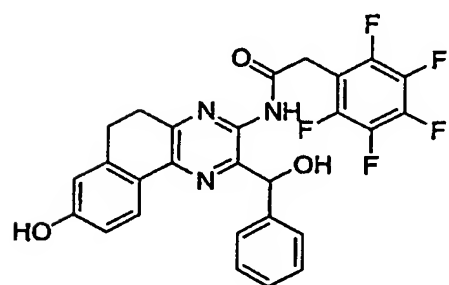
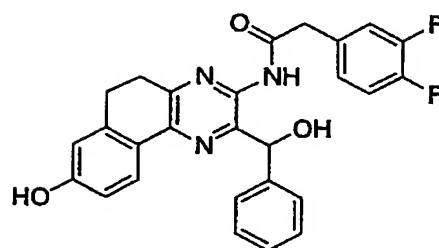
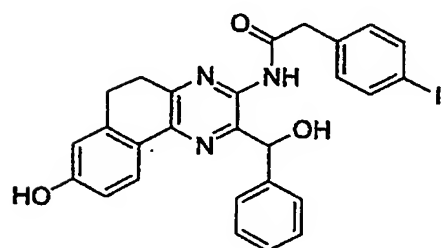
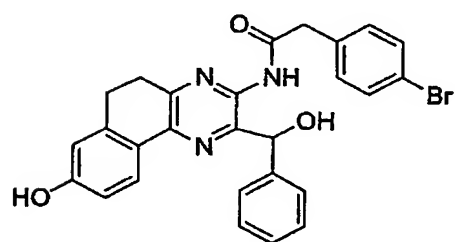
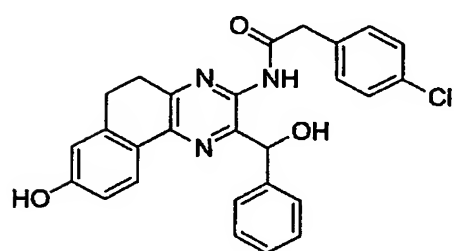
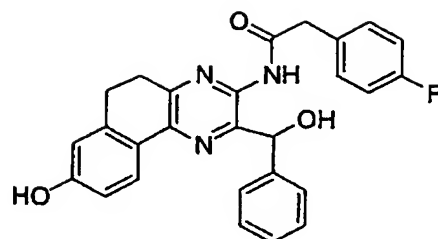
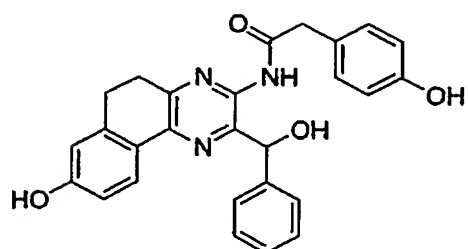
【0325】

【化 226】



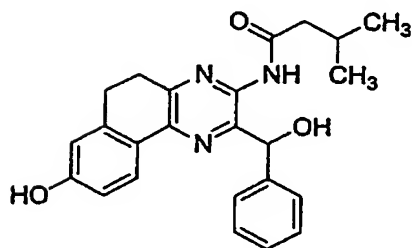
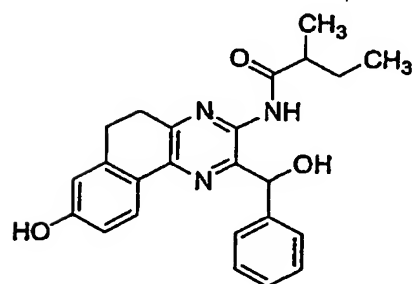
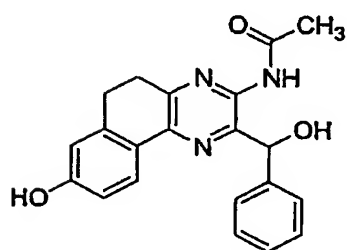
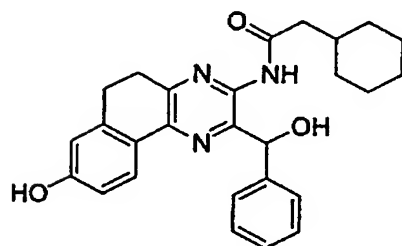
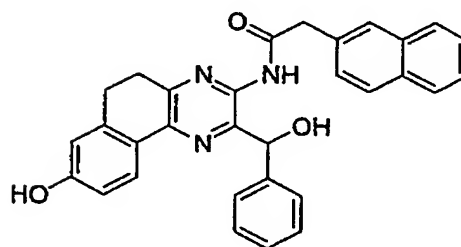
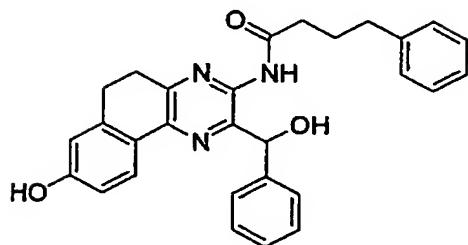
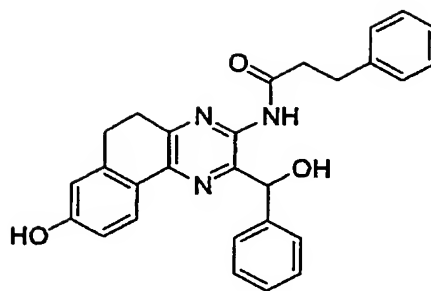
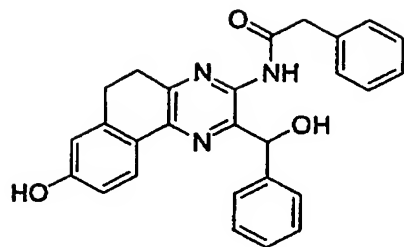
【0326】

【化 227】



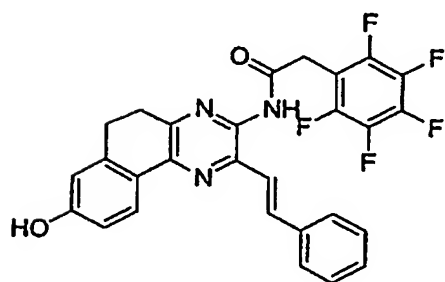
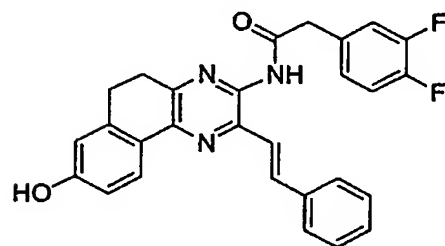
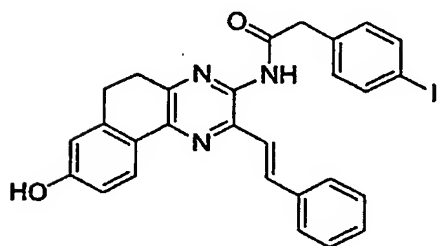
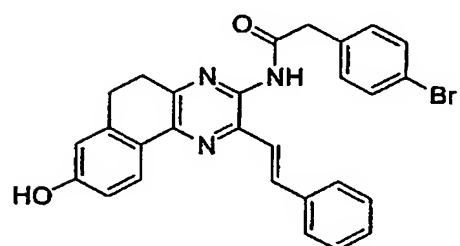
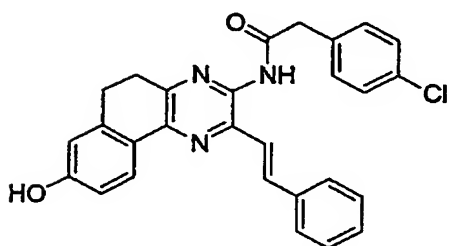
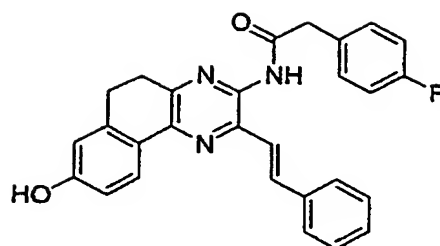
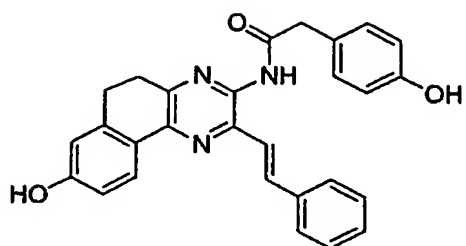
【0327】

【化 228】

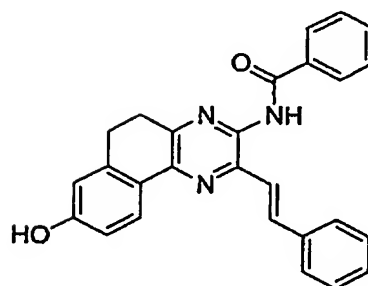


【0328】

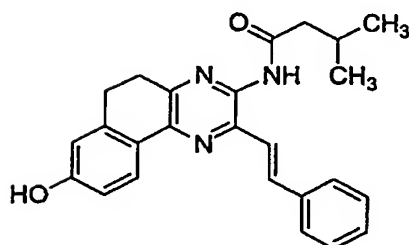
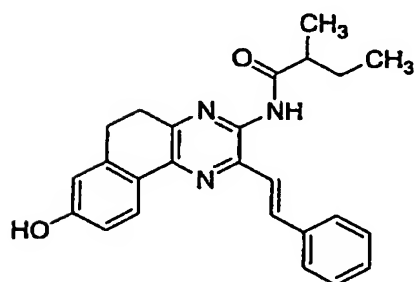
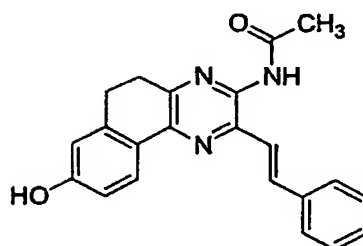
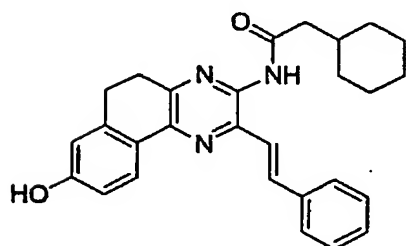
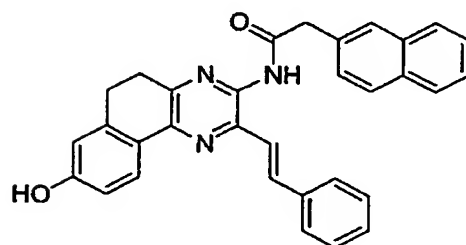
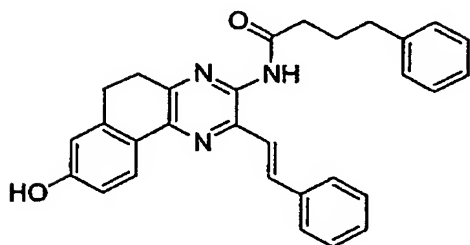
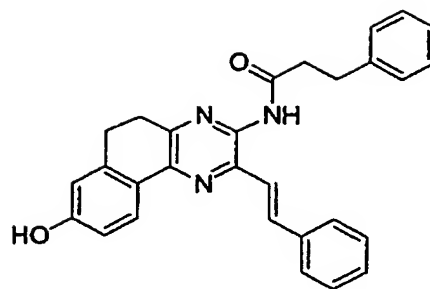
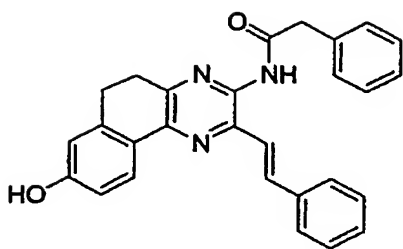
【化 229】



【0329】

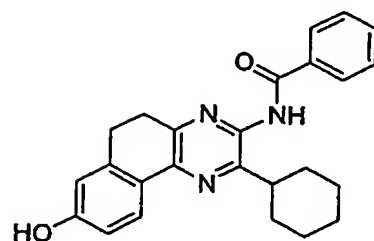
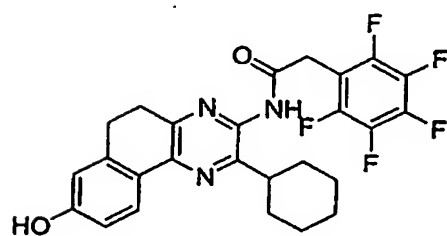
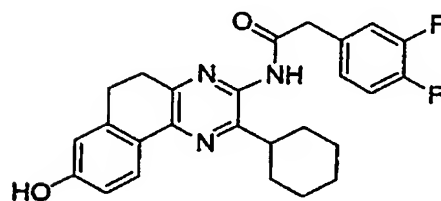
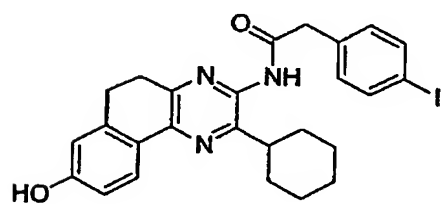
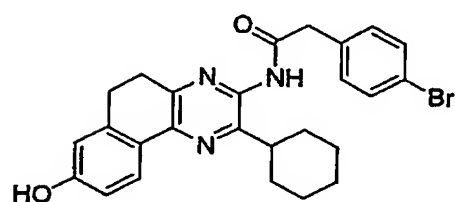
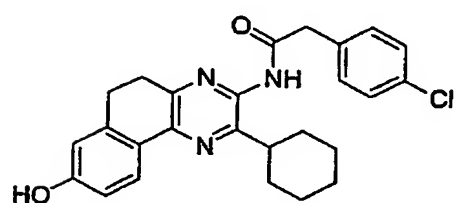
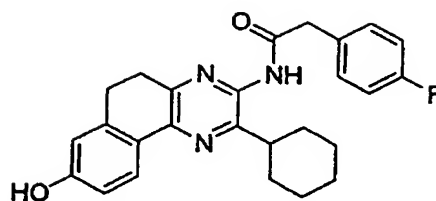
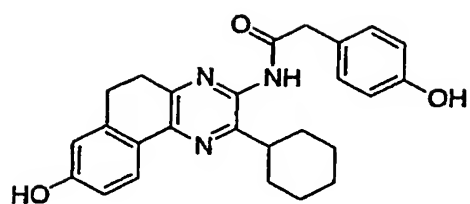


【化 230】



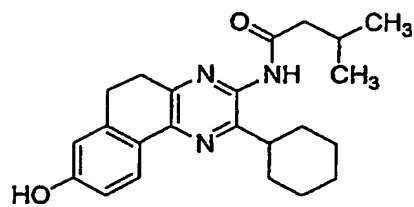
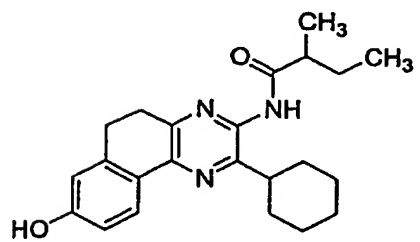
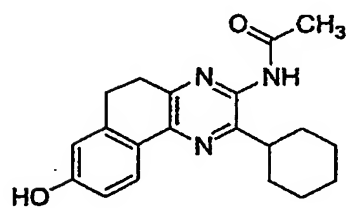
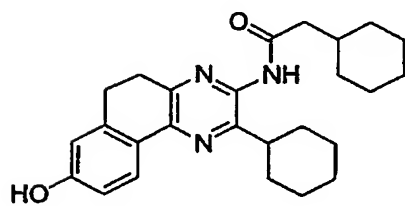
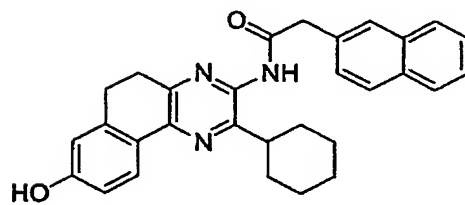
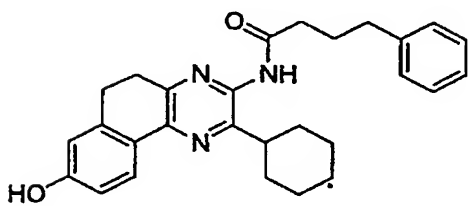
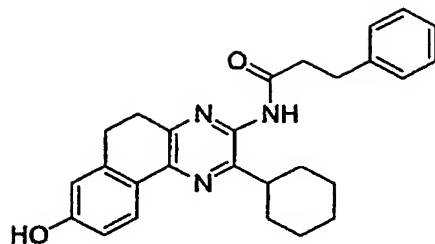
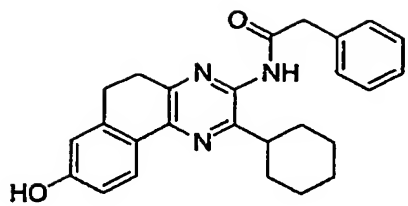
【0330】

【化 231】



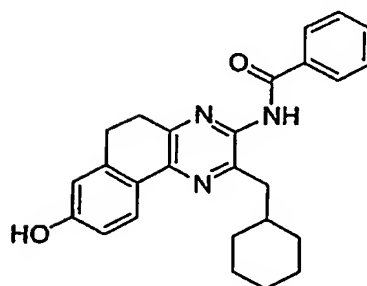
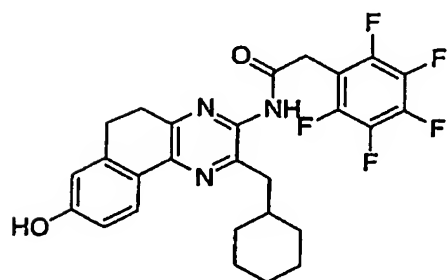
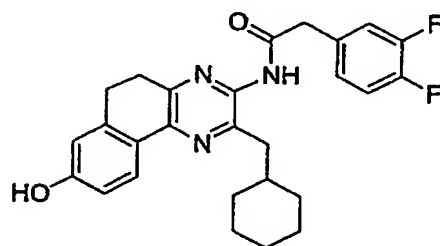
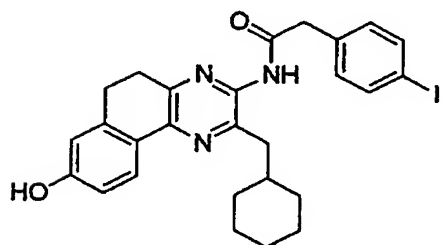
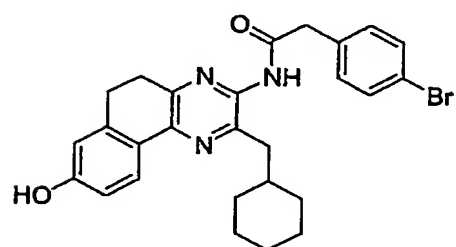
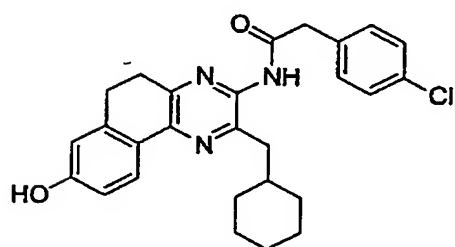
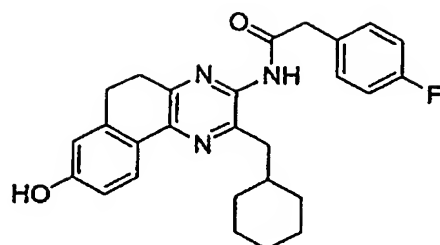
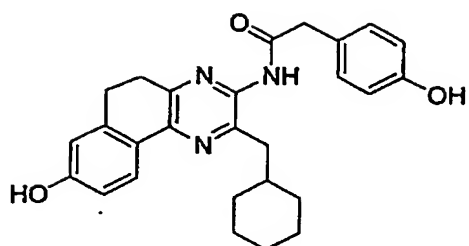
【0331】

【化 232】



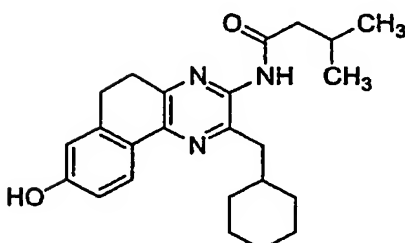
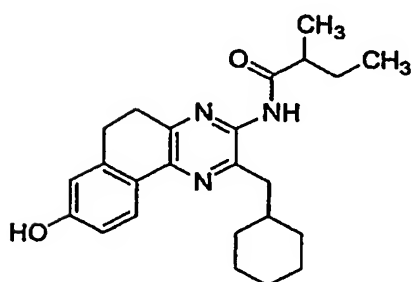
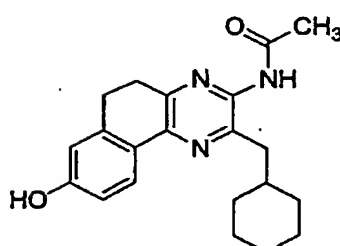
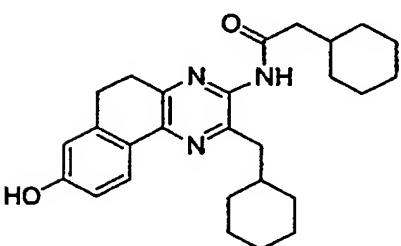
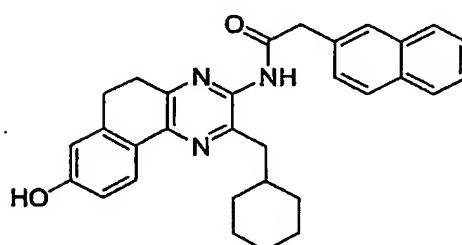
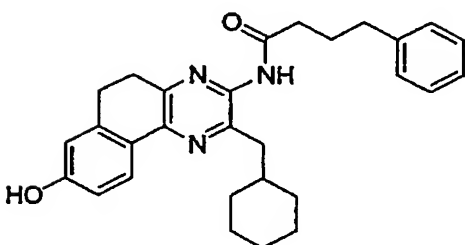
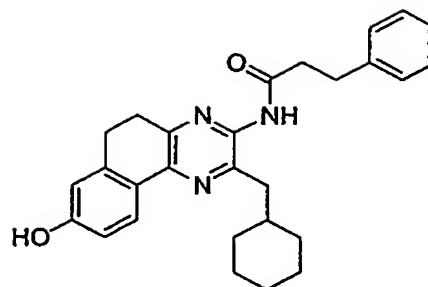
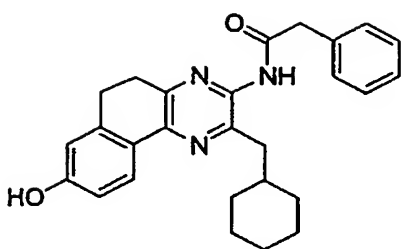
【0332】

【化 2 3 3】



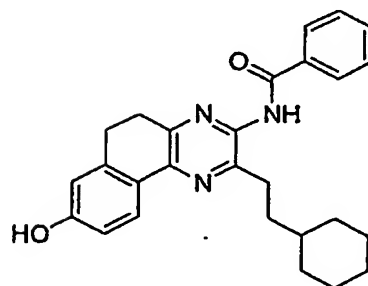
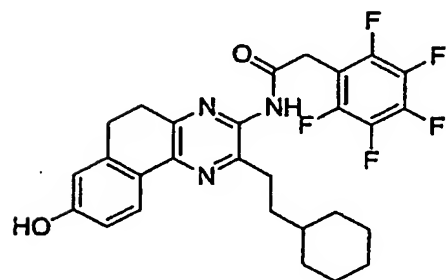
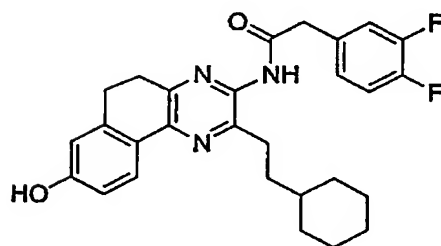
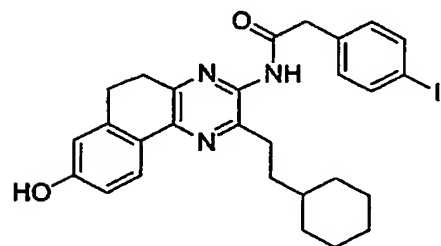
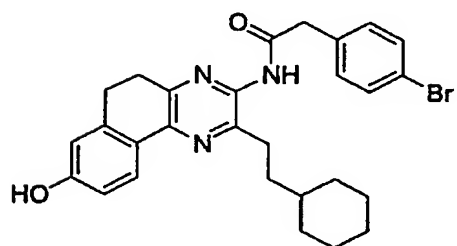
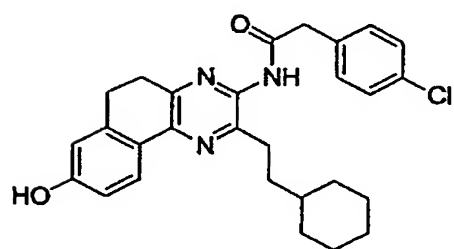
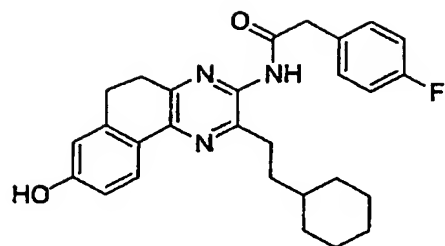
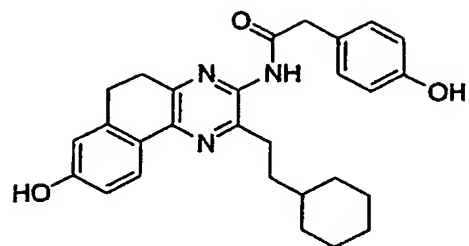
【0 3 3 3】

【化 234】



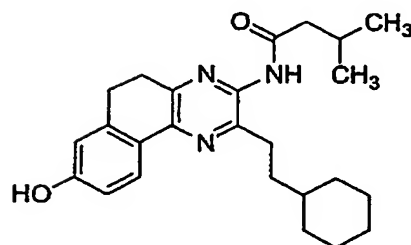
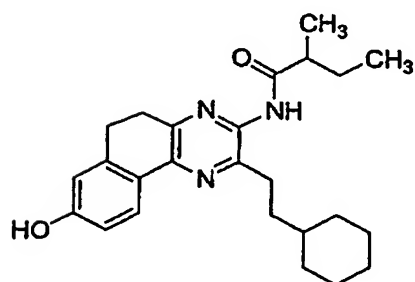
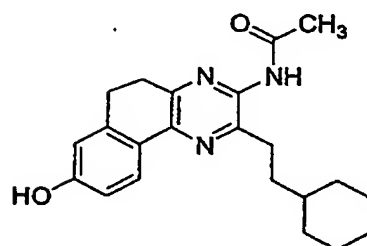
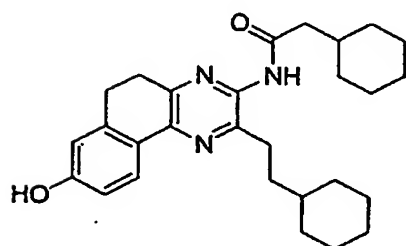
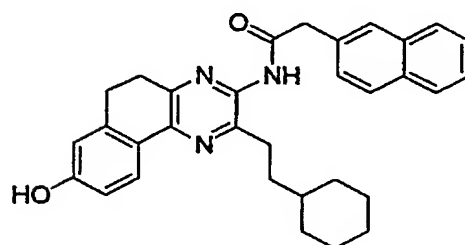
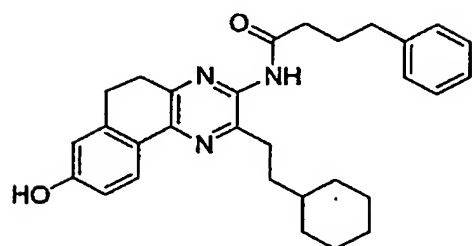
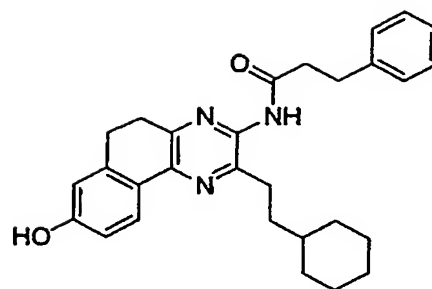
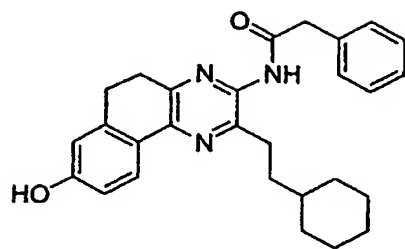
【0334】

【化 235】



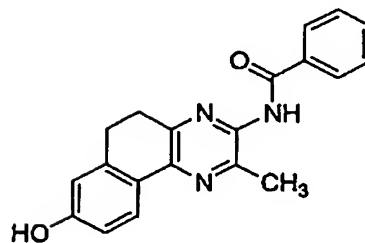
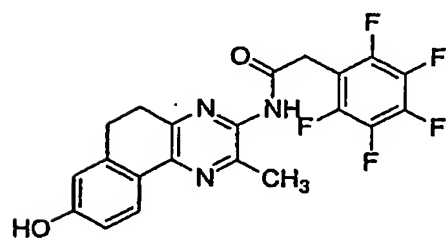
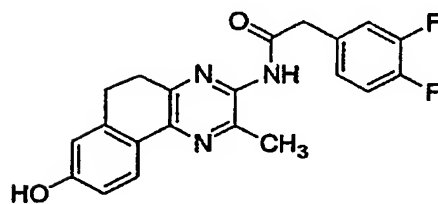
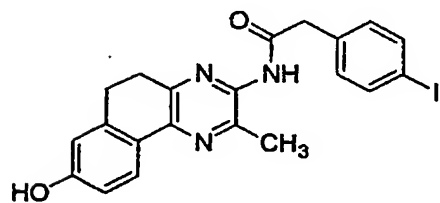
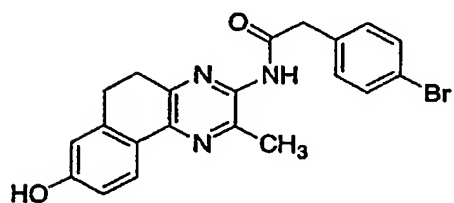
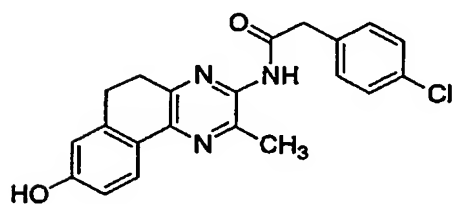
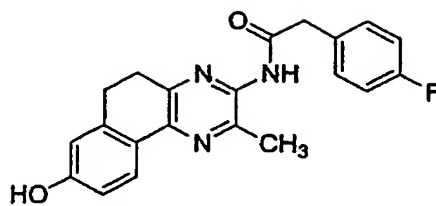
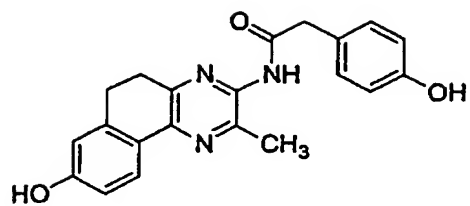
【0335】

【化 236】



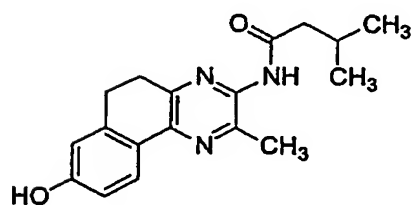
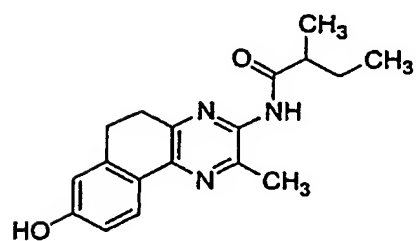
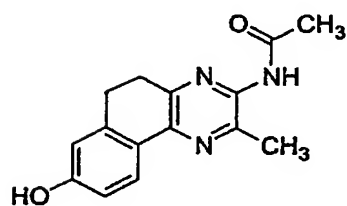
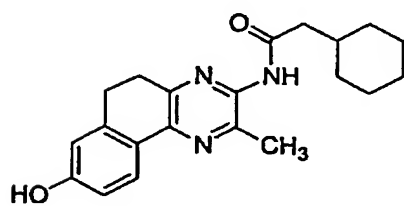
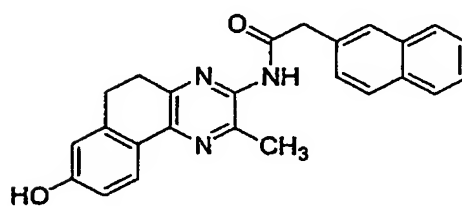
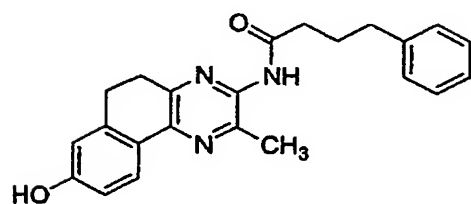
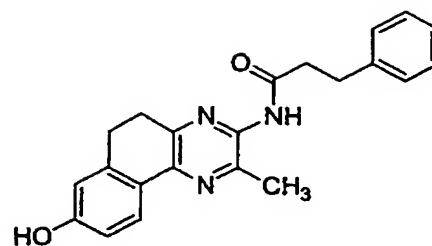
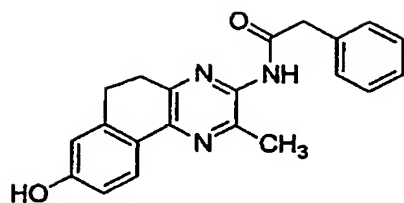
【0336】

【化 237】



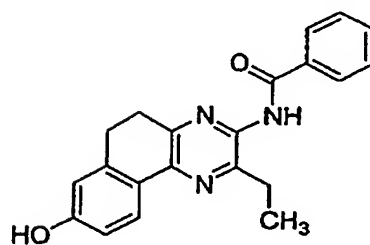
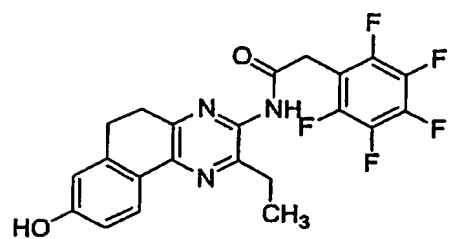
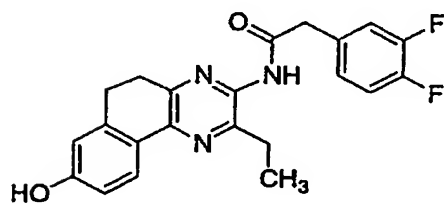
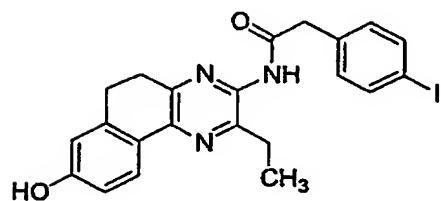
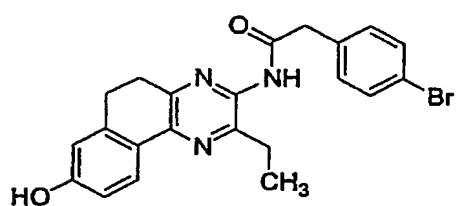
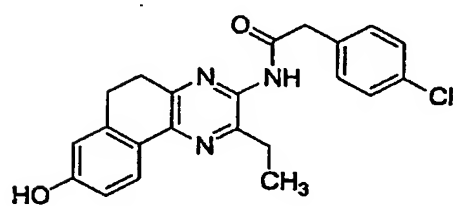
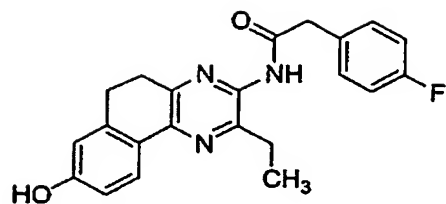
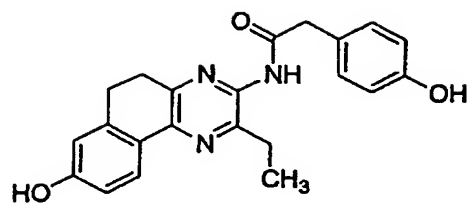
【0337】

【化 238】



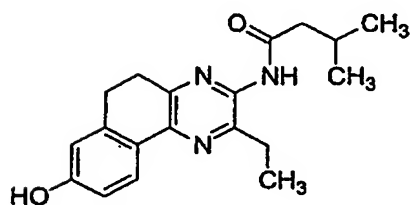
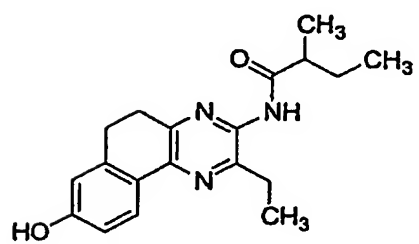
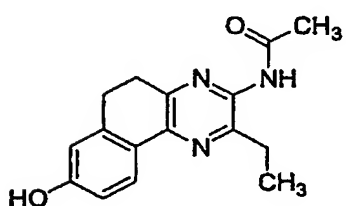
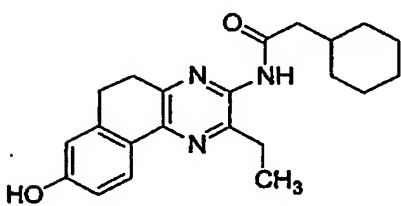
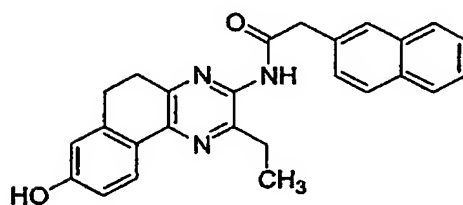
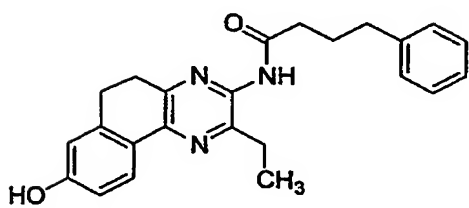
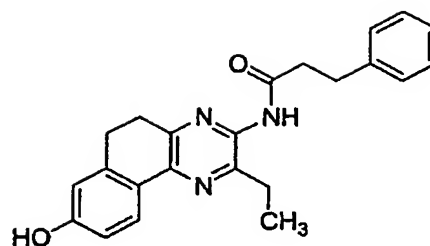
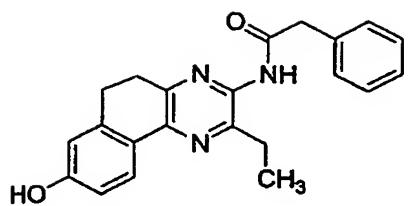
【0338】

【化 239】



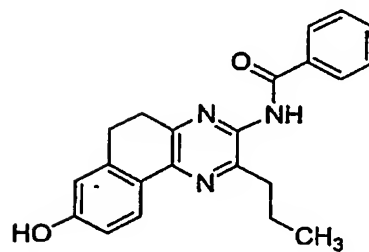
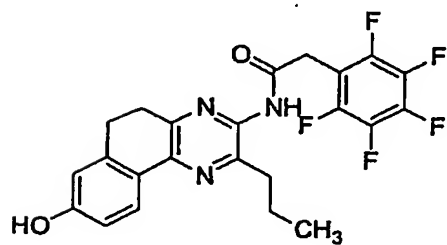
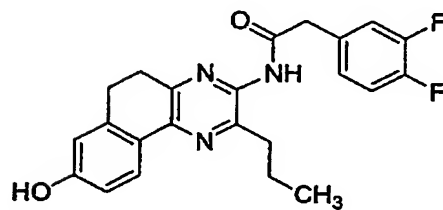
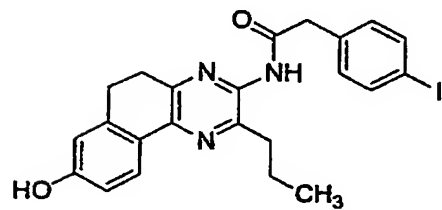
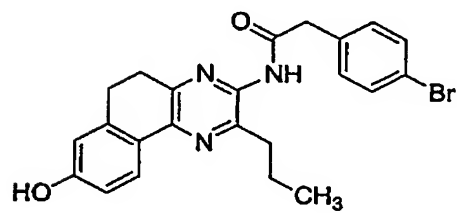
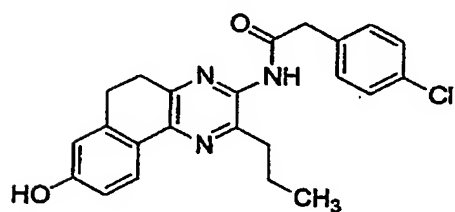
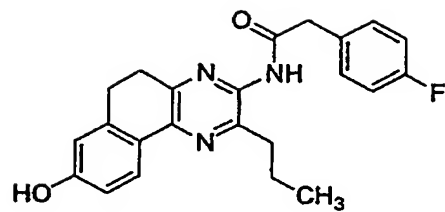
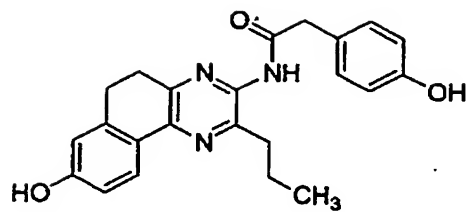
【0339】

【化 240】



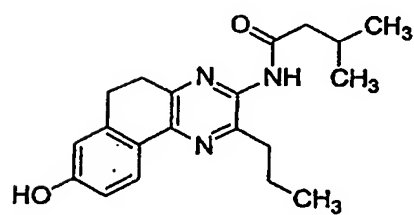
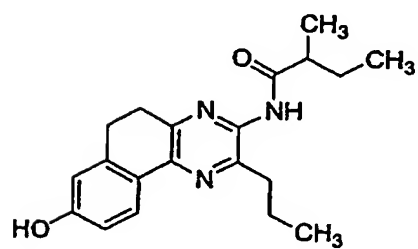
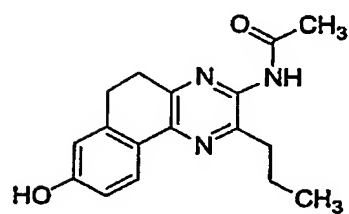
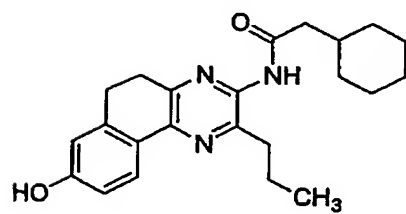
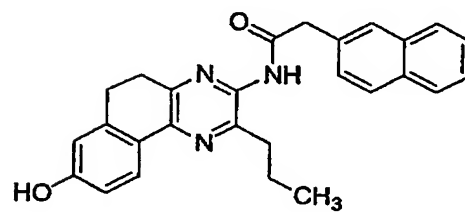
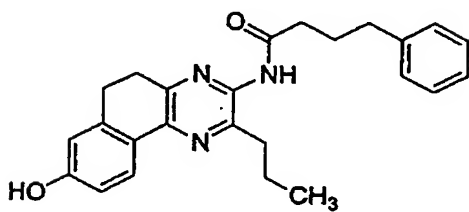
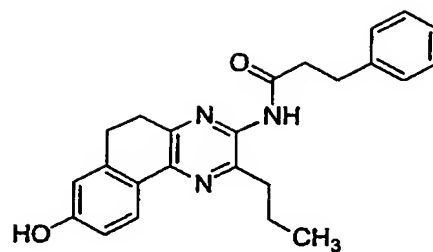
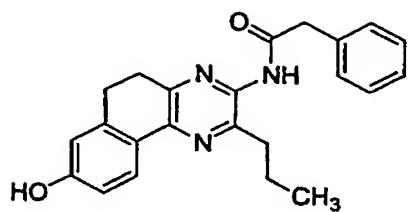
【0340】

【化 2 4 1】



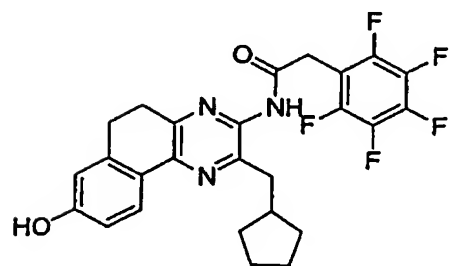
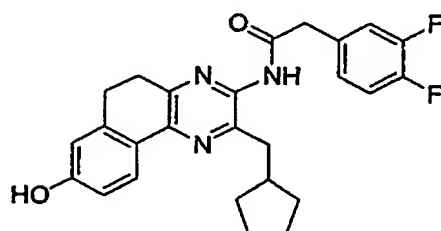
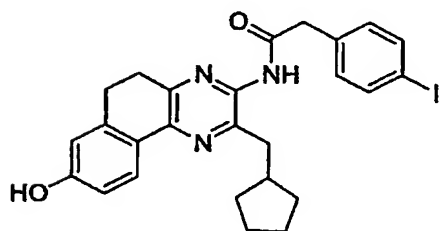
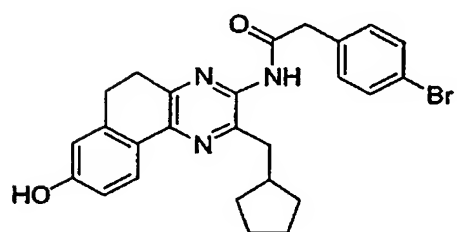
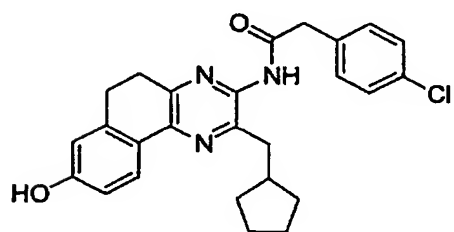
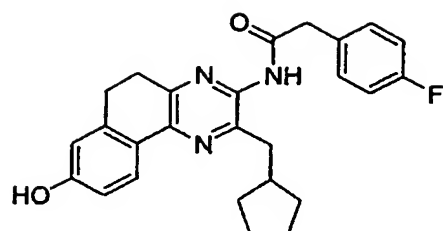
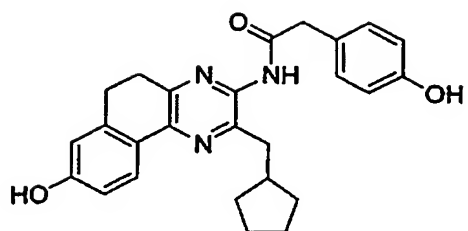
【0 3 4 1】

【化 2 4 2】

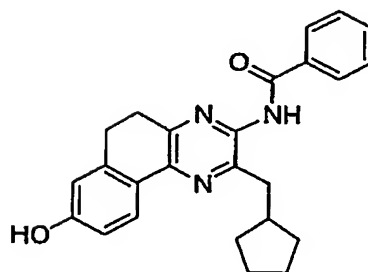


【0 3 4 2】

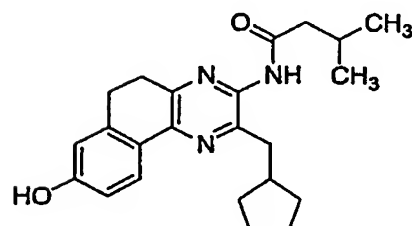
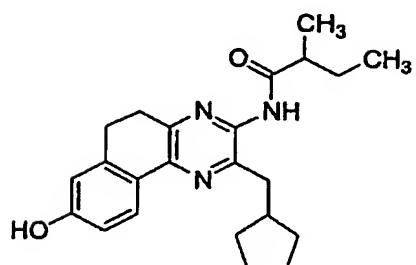
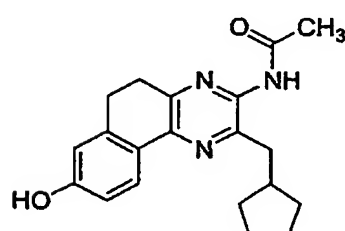
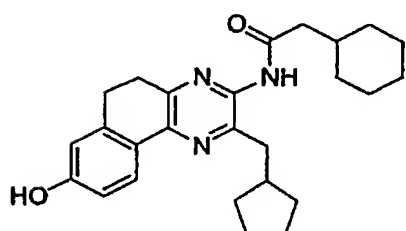
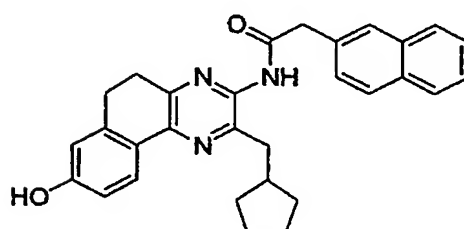
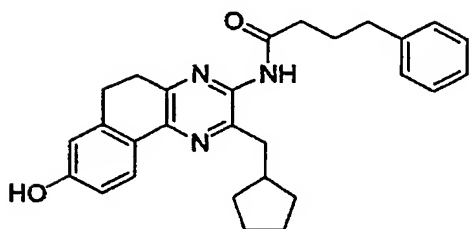
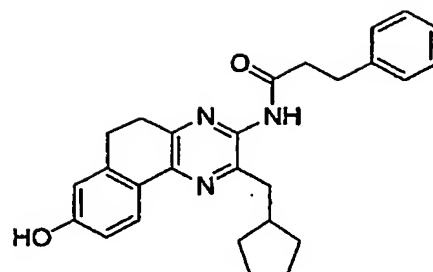
【化 2 4 3】



【 0 3 4 3 】

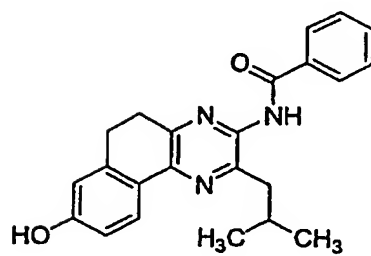
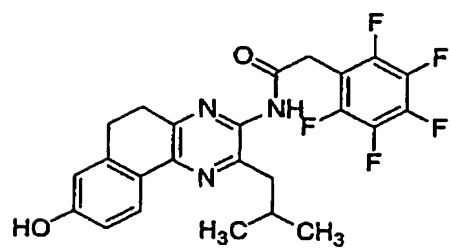
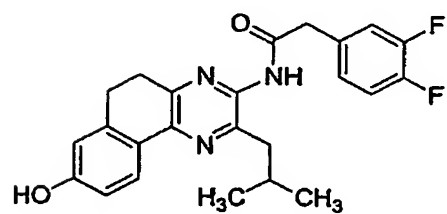
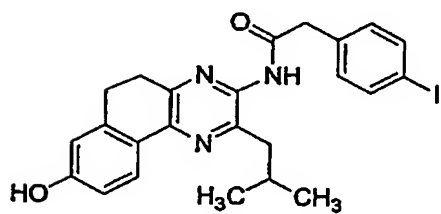
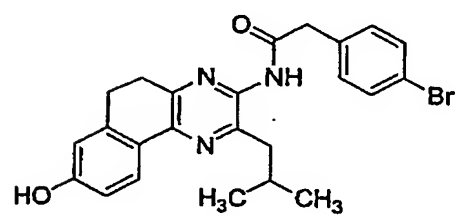
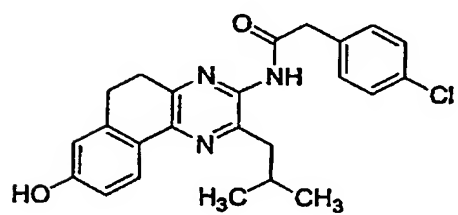
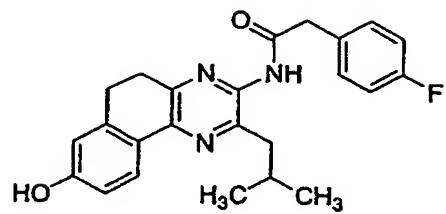
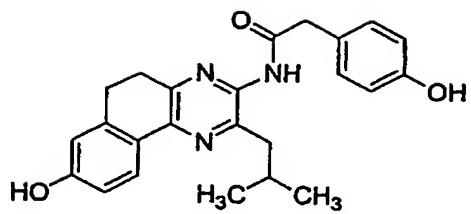


【化 244】



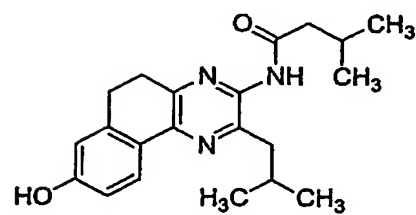
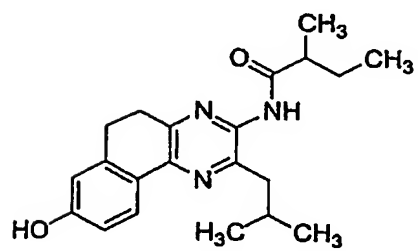
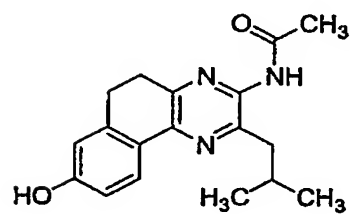
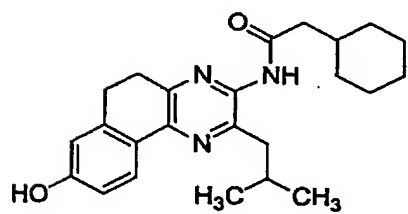
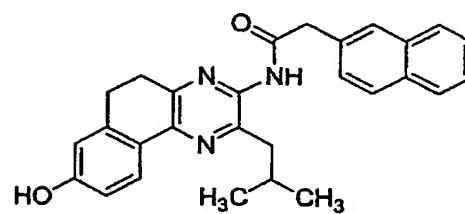
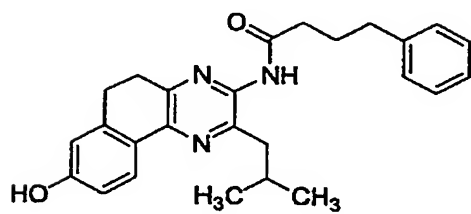
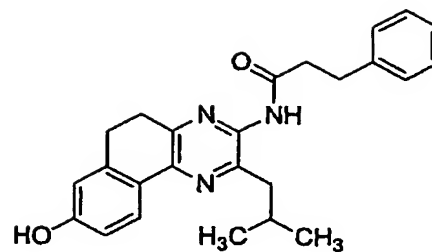
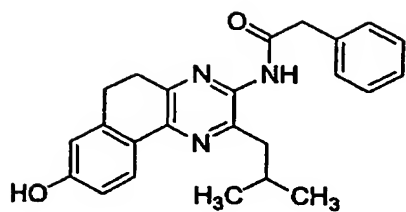
【0344】

【化 245】



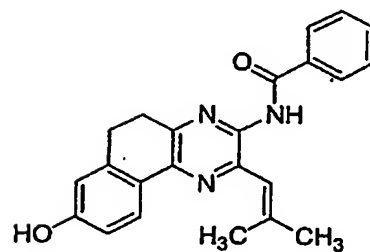
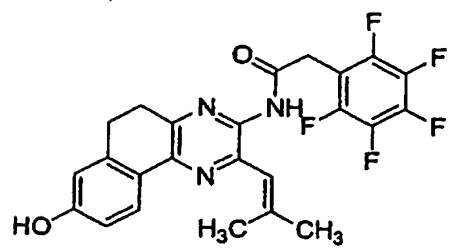
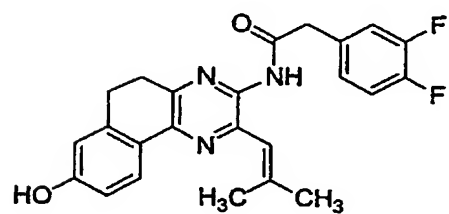
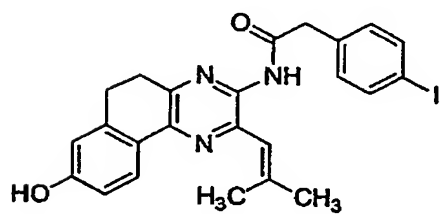
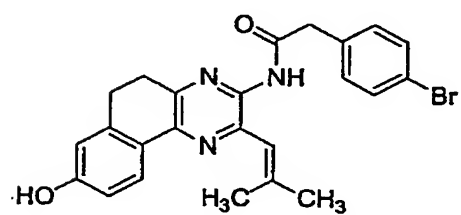
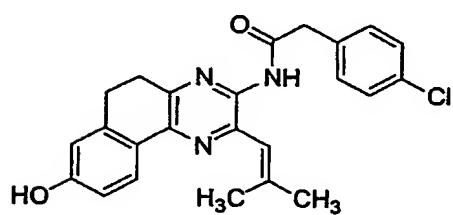
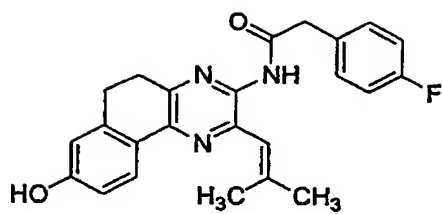
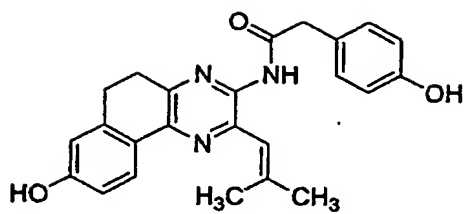
【 0 3 4 5 】

【化 246】



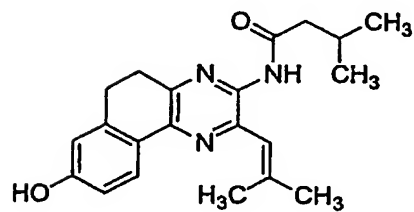
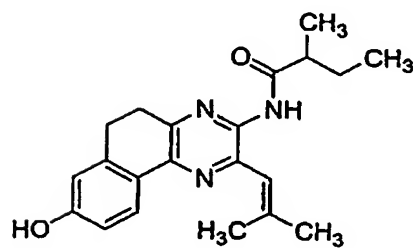
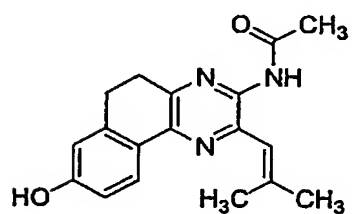
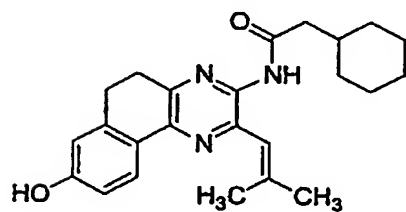
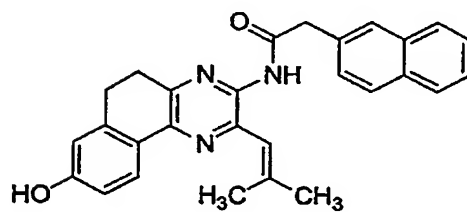
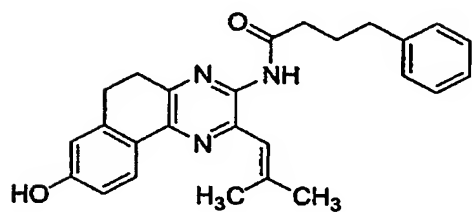
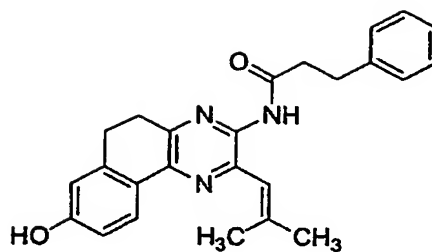
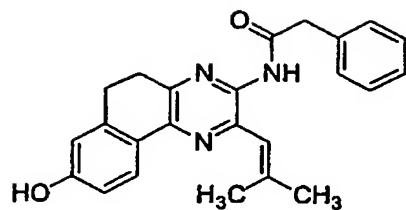
【0346】

【化 247】



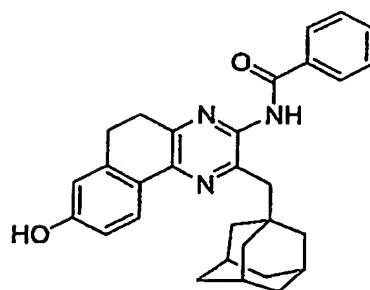
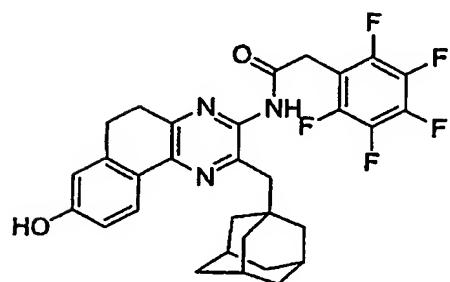
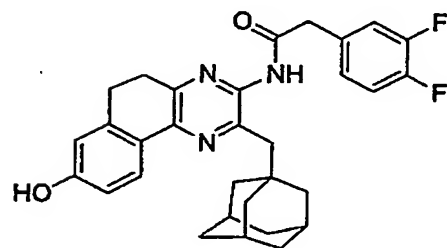
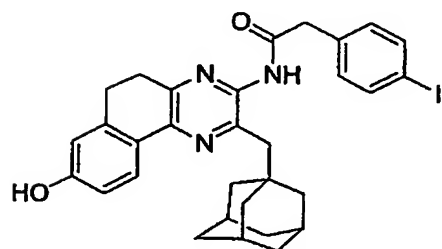
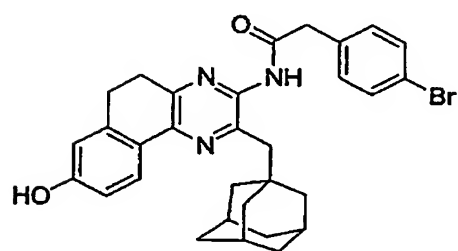
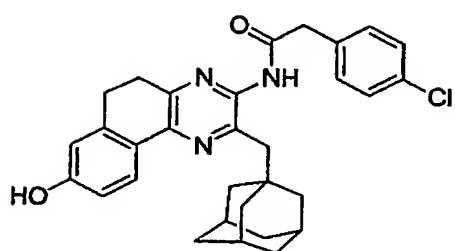
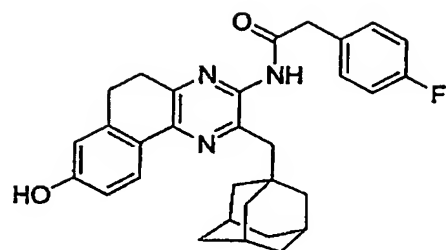
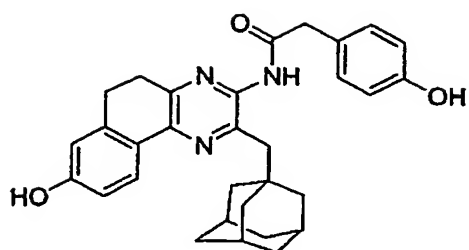
【 0 3 4 7 】

【化 248】



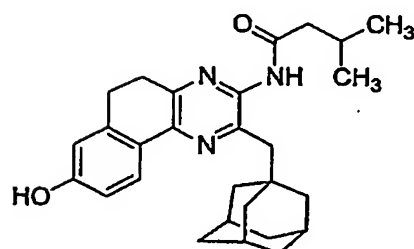
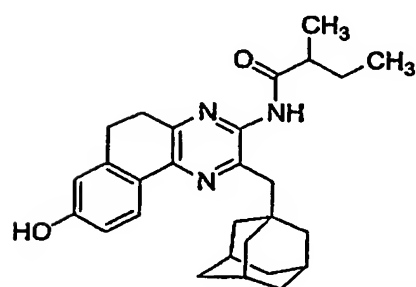
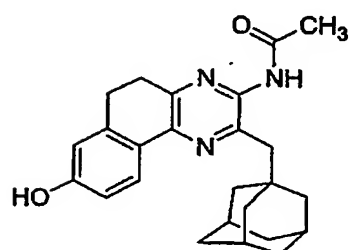
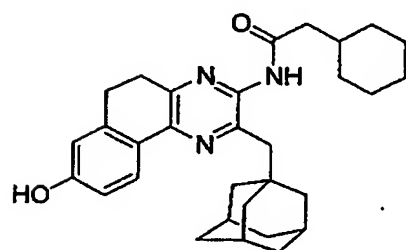
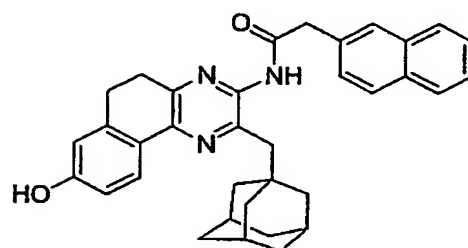
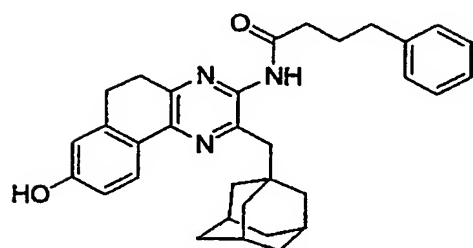
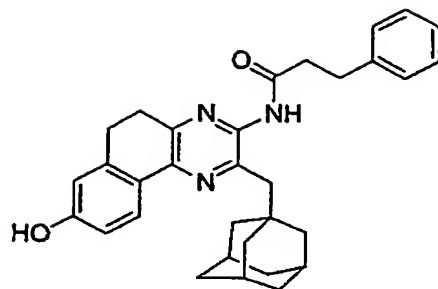
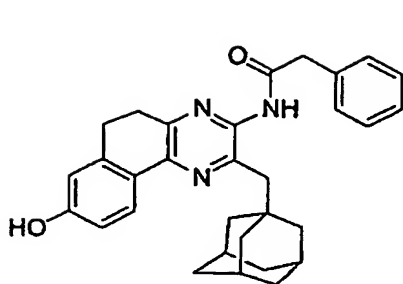
【0348】

【化 249】



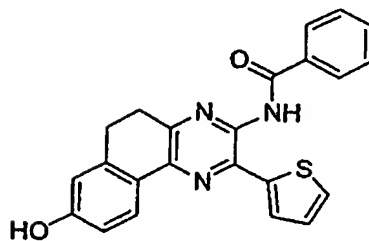
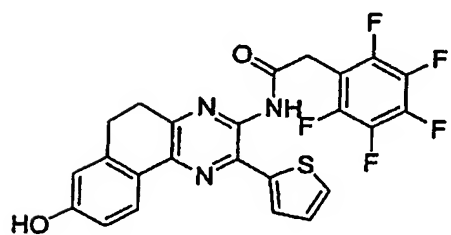
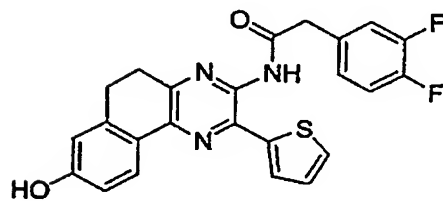
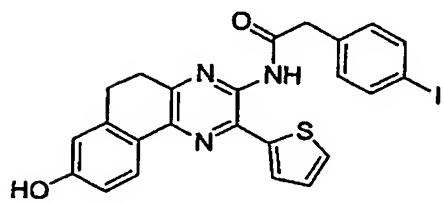
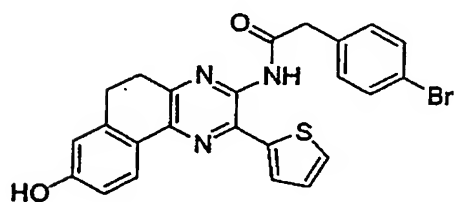
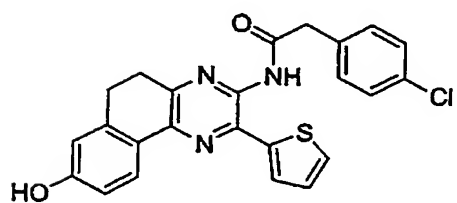
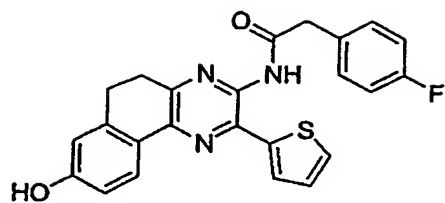
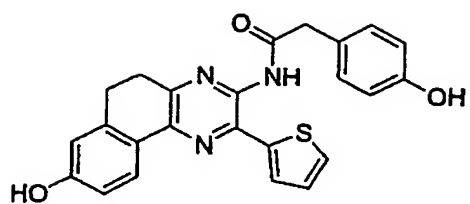
【0349】

【化 250】



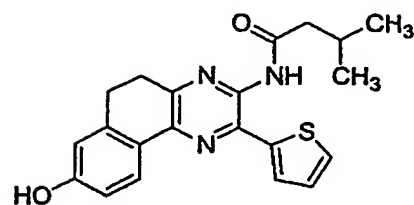
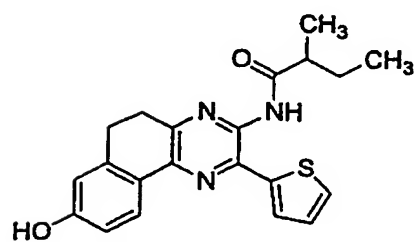
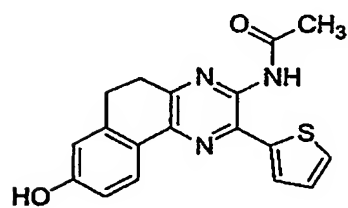
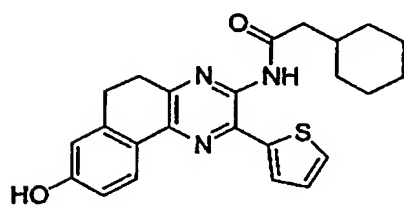
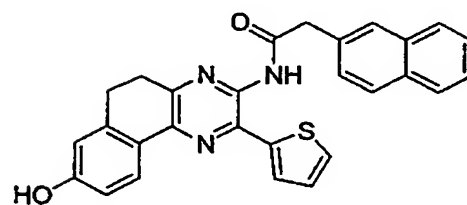
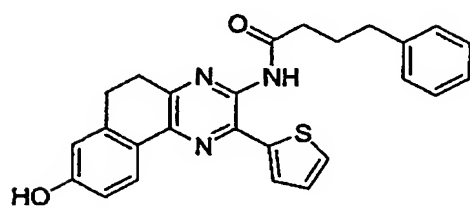
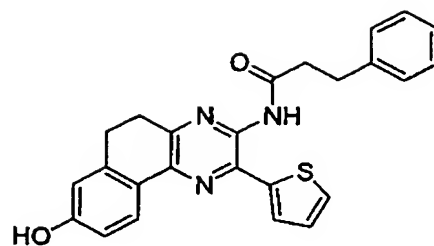
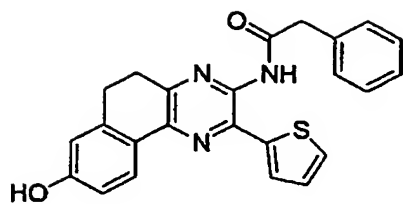
【0350】

【化 251】



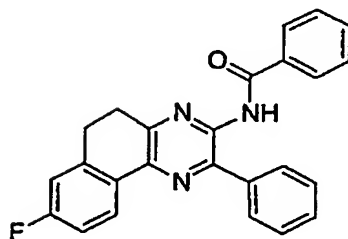
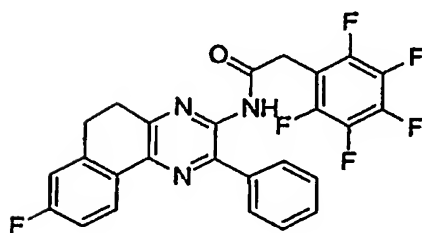
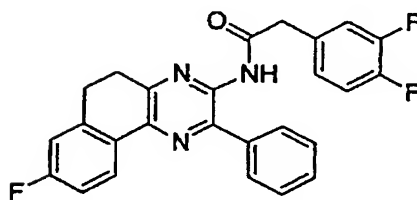
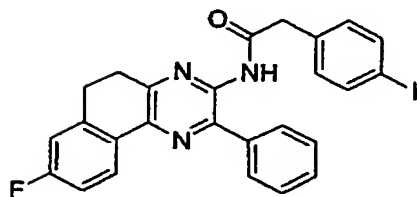
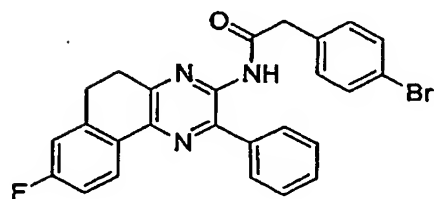
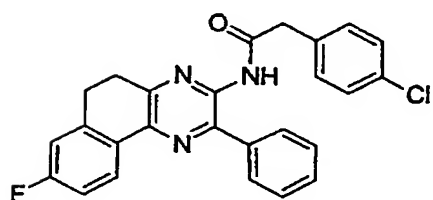
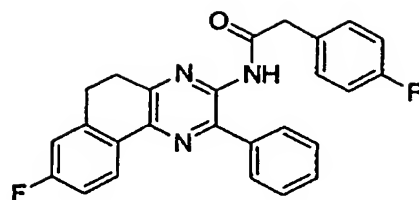
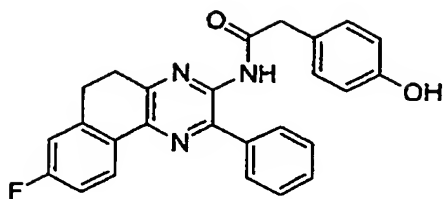
【0351】

【化 252】



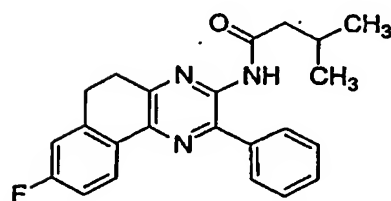
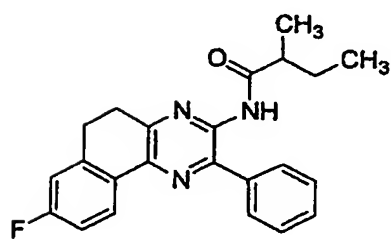
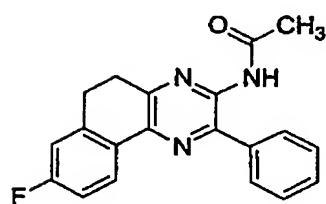
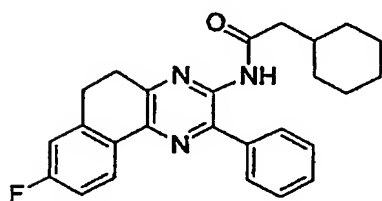
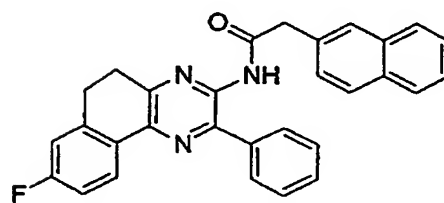
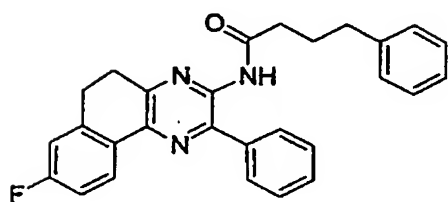
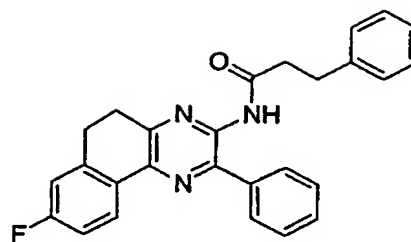
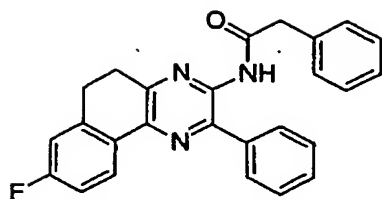
【0352】

【化 253】



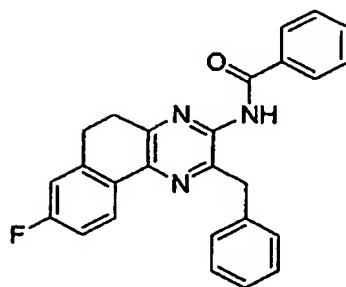
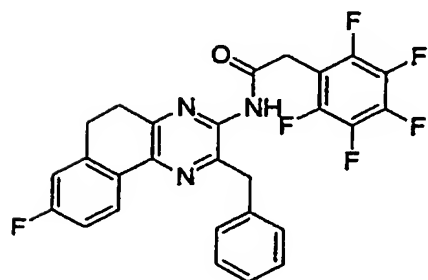
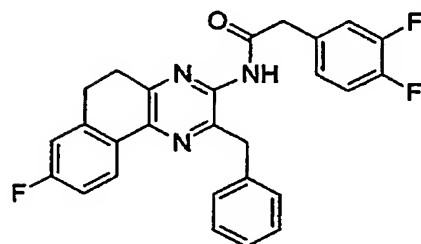
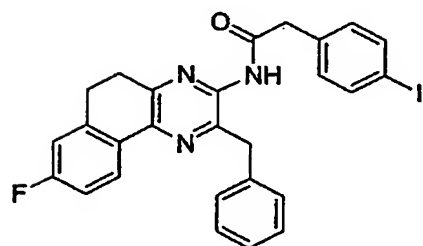
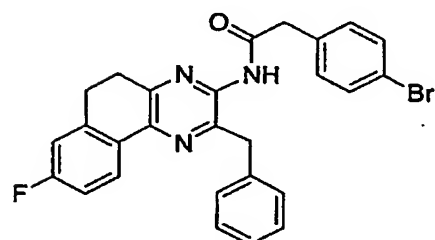
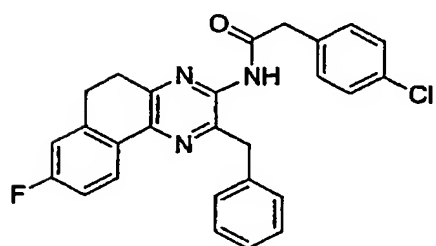
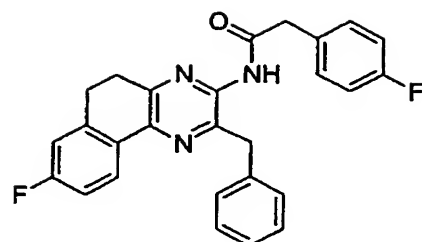
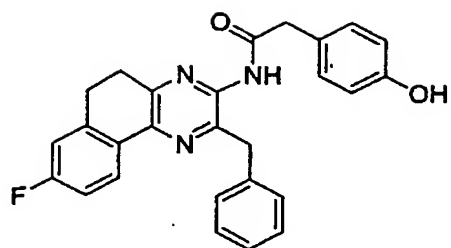
【0353】

【化 254】



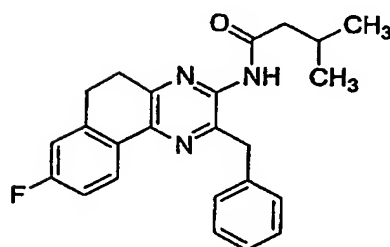
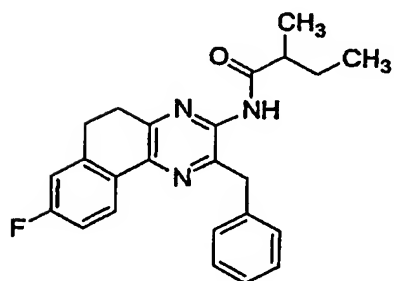
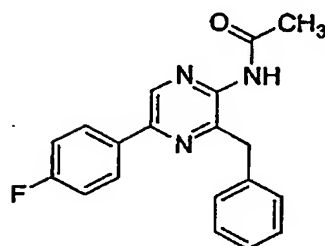
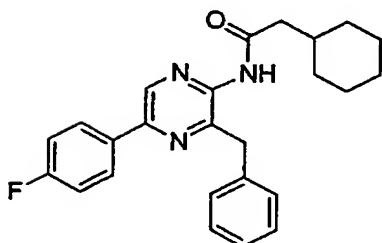
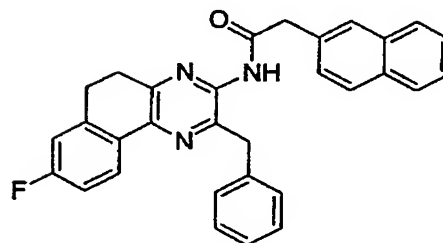
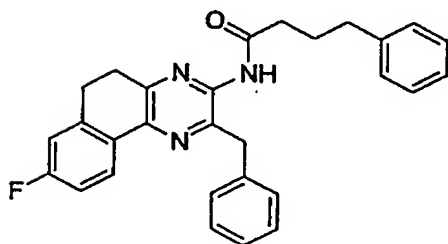
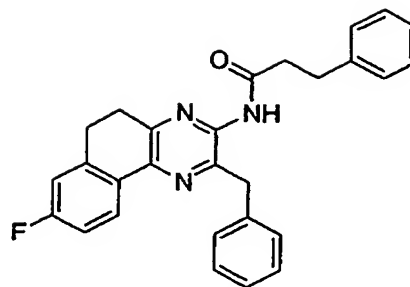
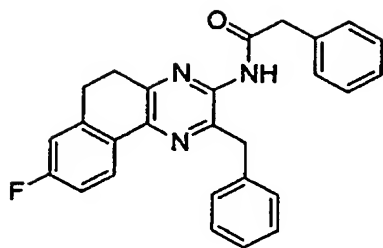
【0354】

【化 255】



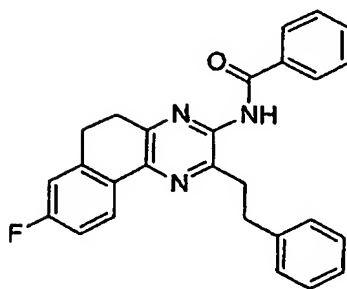
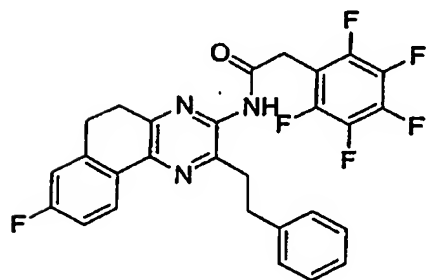
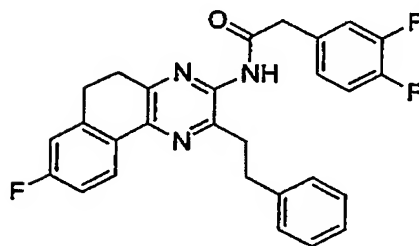
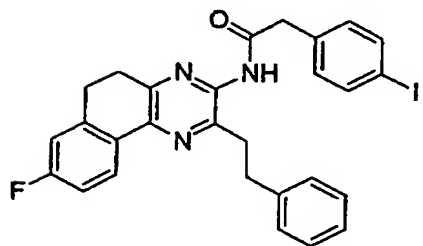
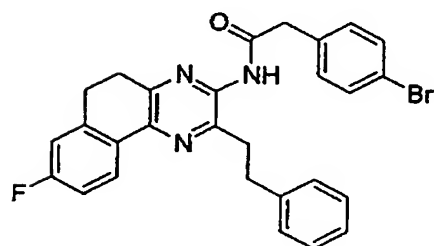
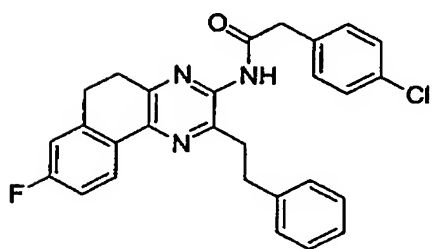
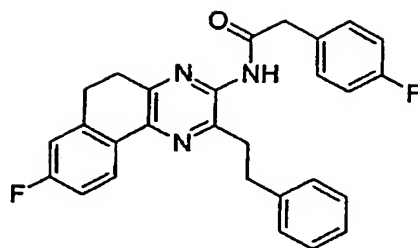
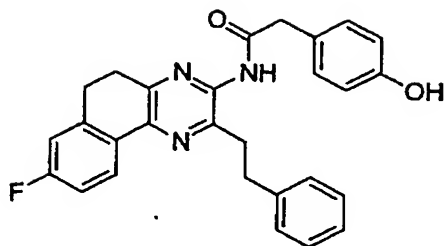
【0355】

【化 256】



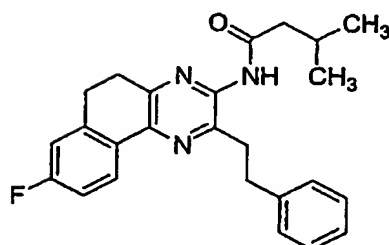
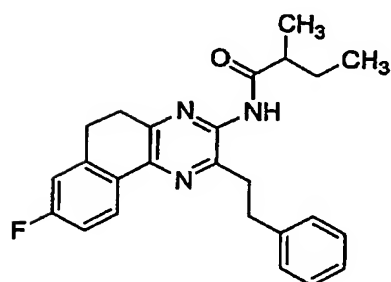
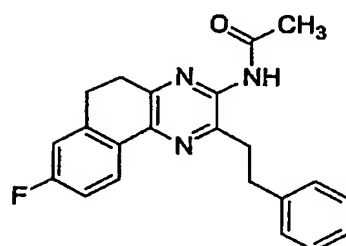
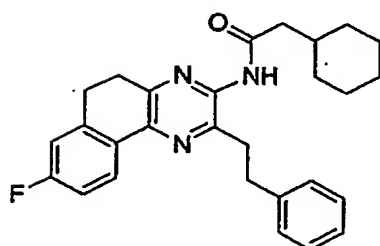
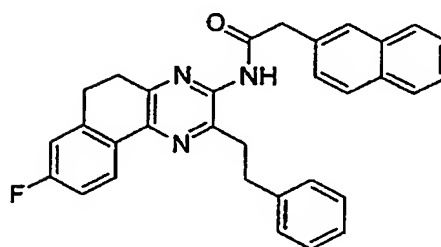
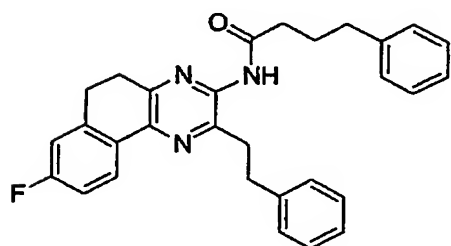
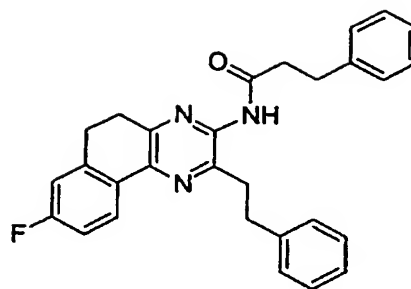
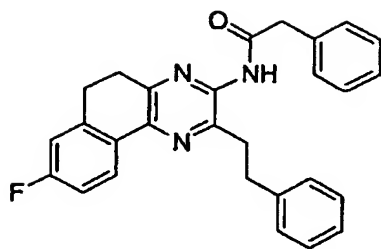
【0356】

【化 257】



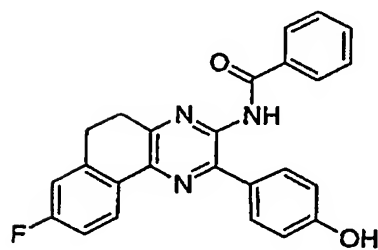
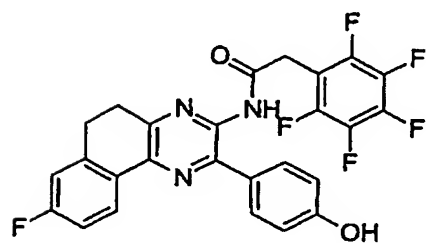
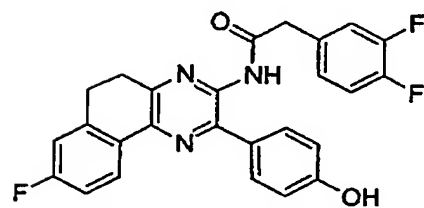
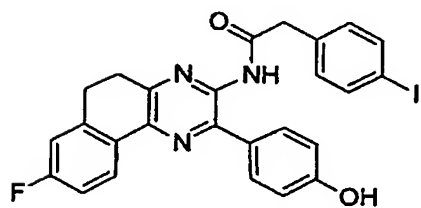
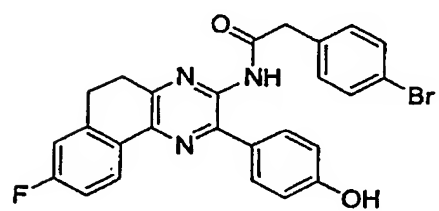
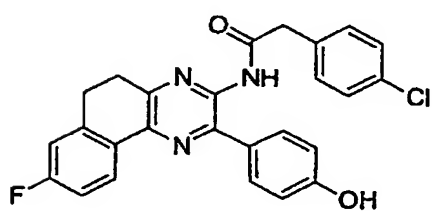
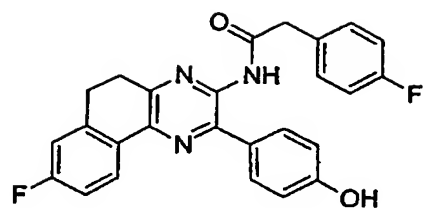
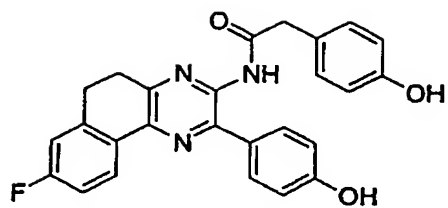
【0357】

【化 258】



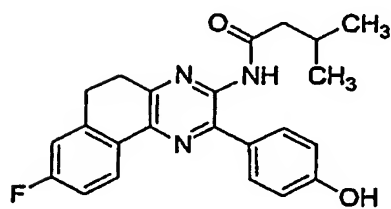
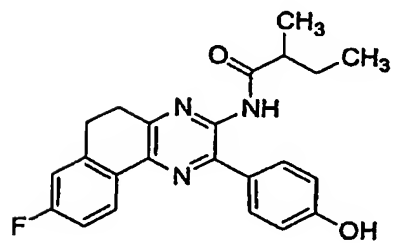
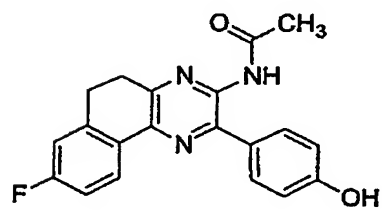
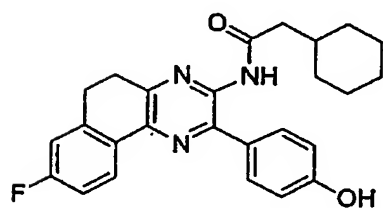
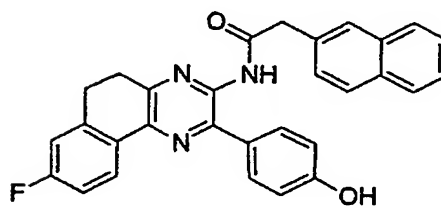
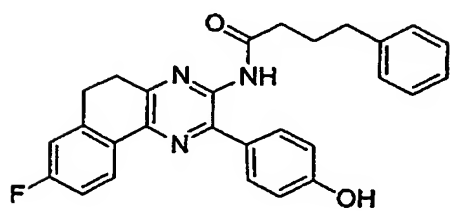
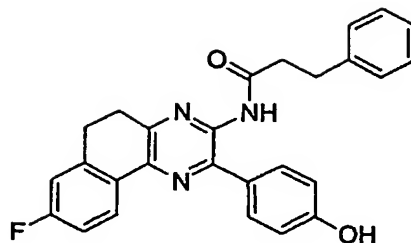
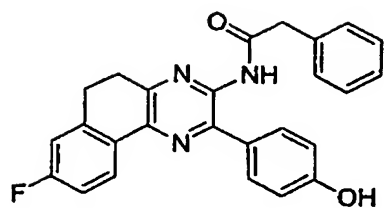
【0358】

【化 259】



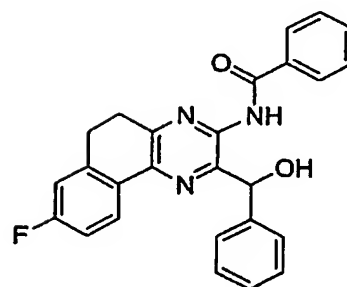
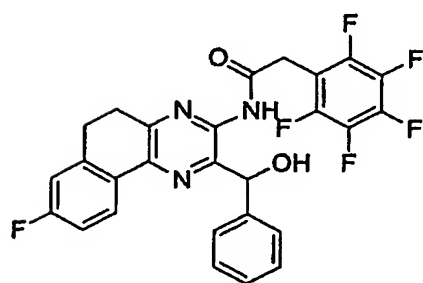
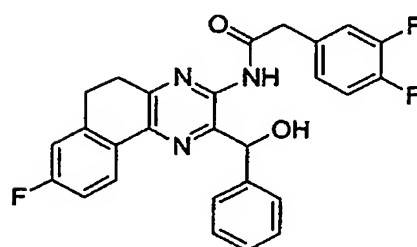
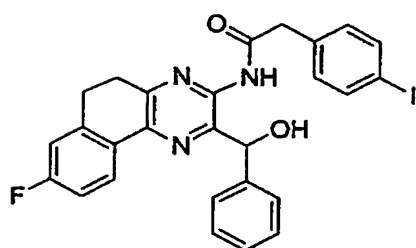
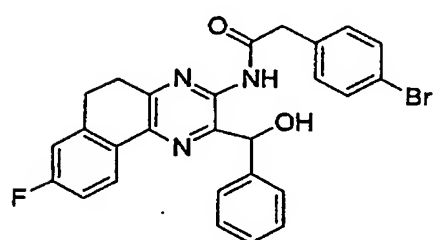
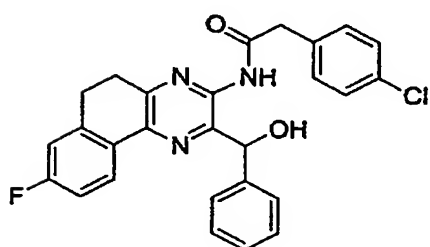
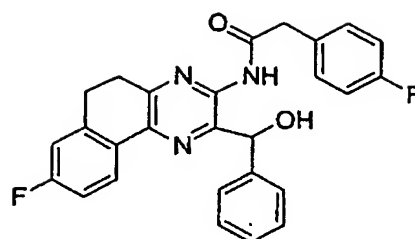
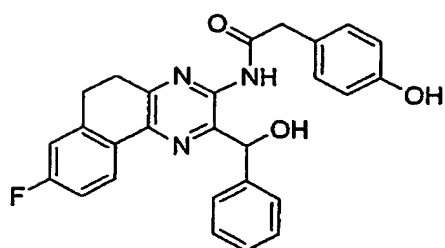
【 0359】

【化 260】



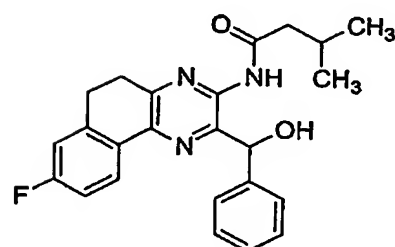
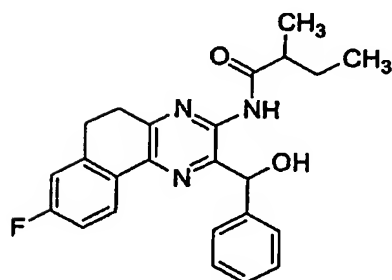
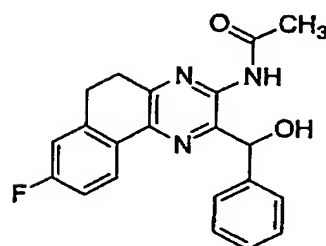
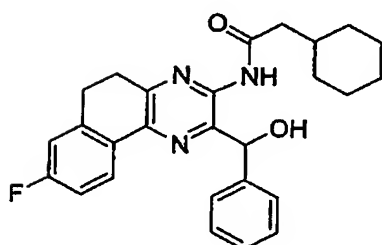
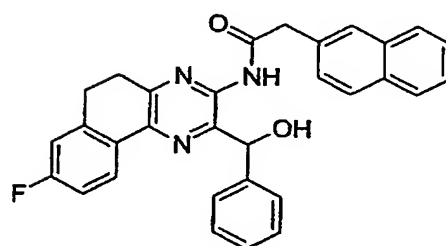
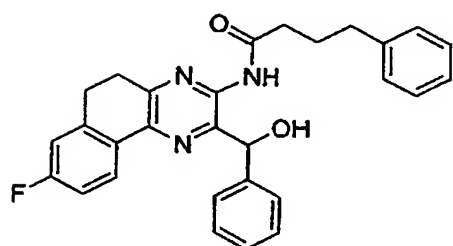
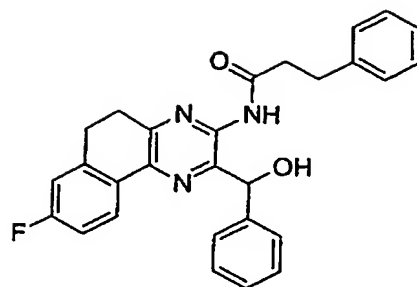
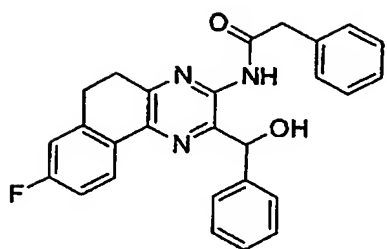
【0360】

【化 261】



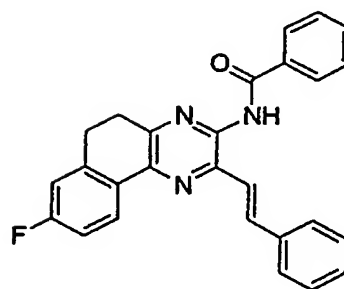
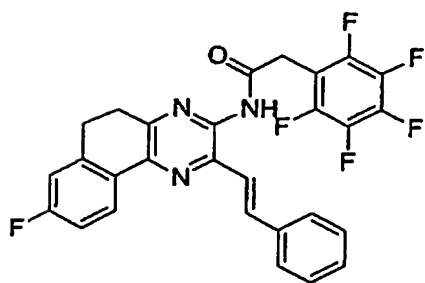
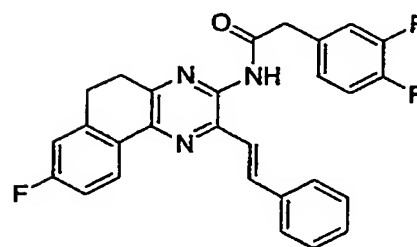
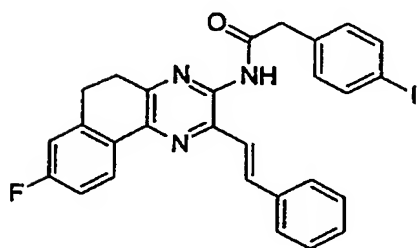
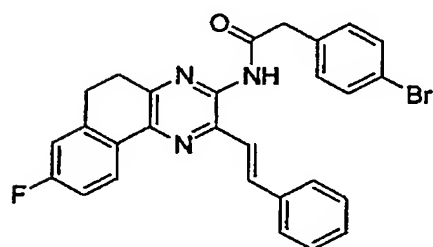
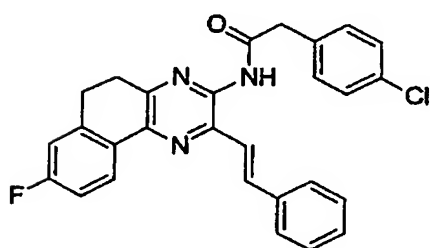
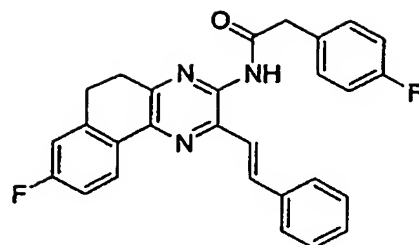
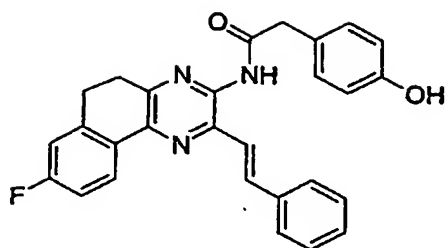
【0361】

【化 262】



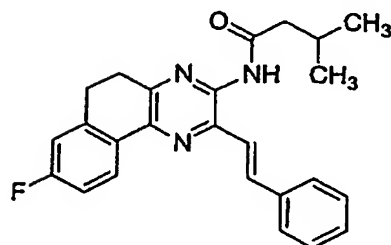
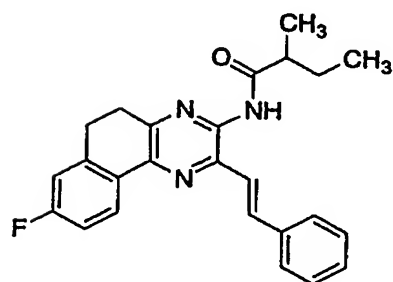
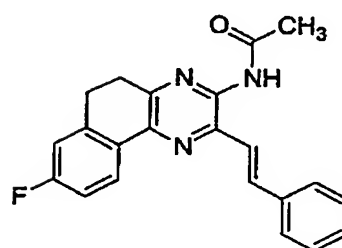
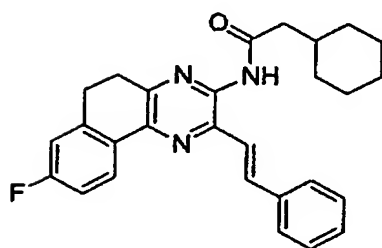
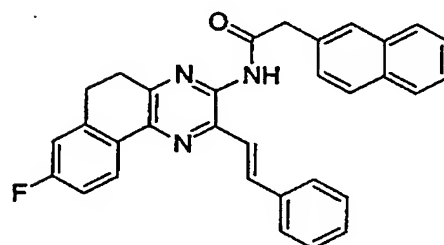
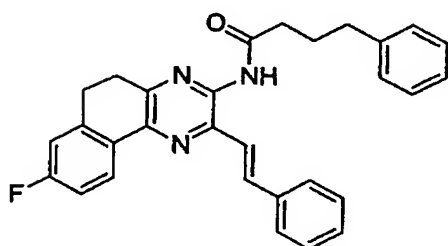
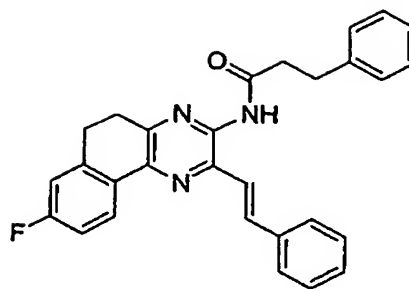
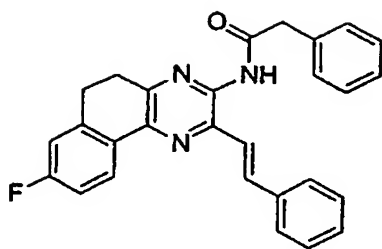
【0362】

【化 263】



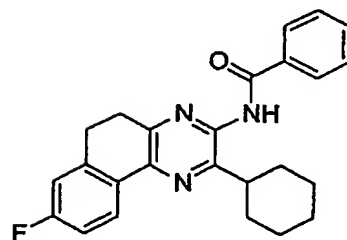
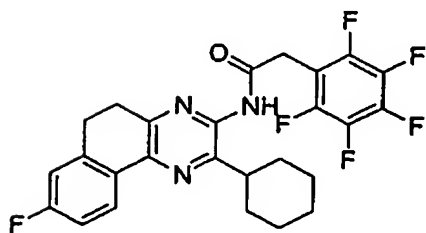
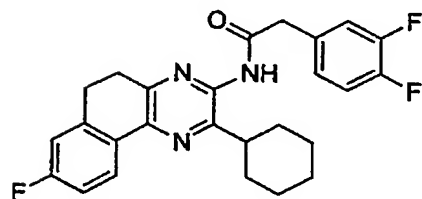
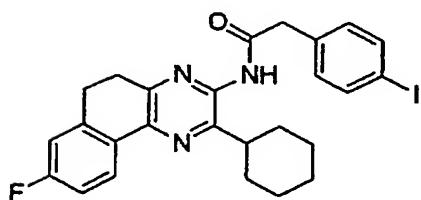
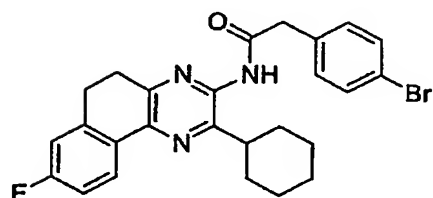
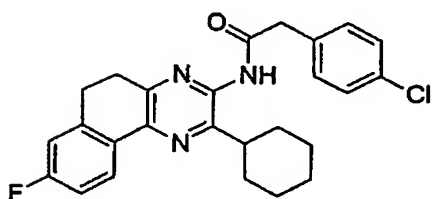
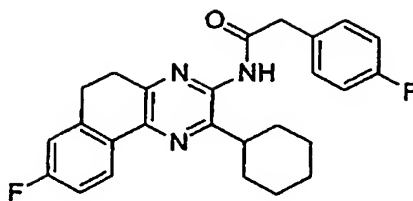
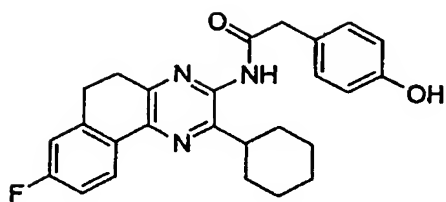
【0363】

【化 264】



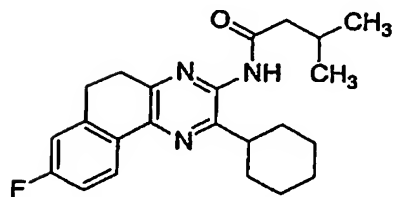
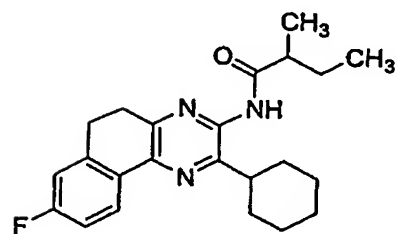
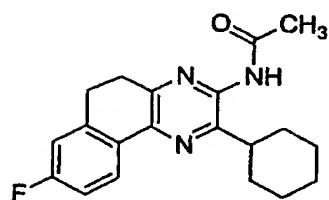
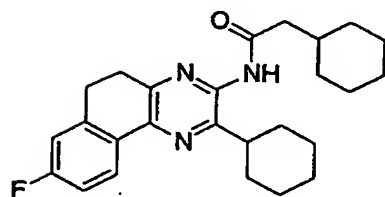
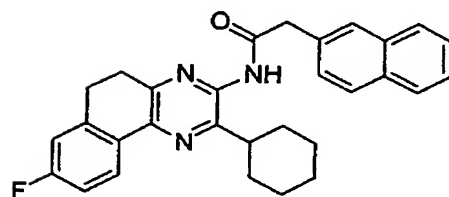
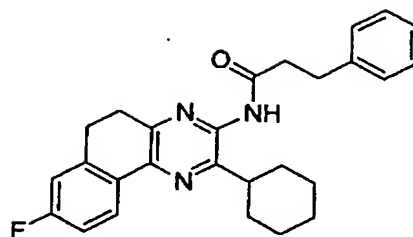
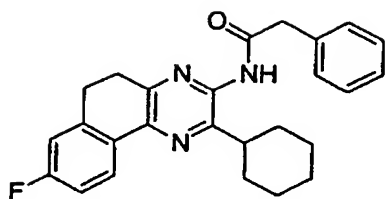
【0364】

【化 265】



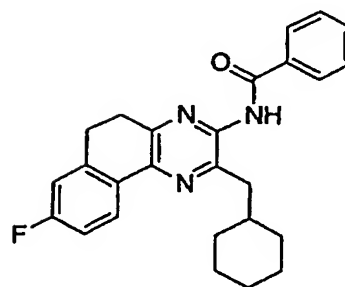
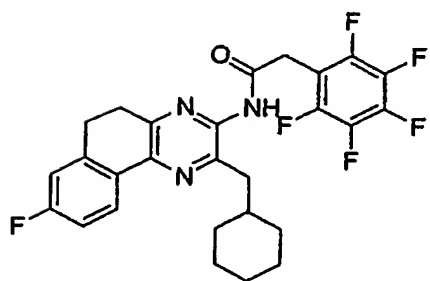
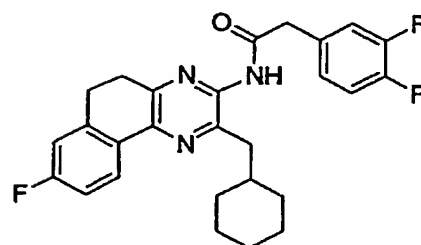
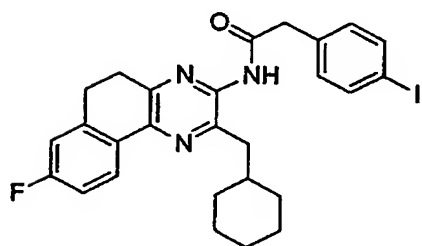
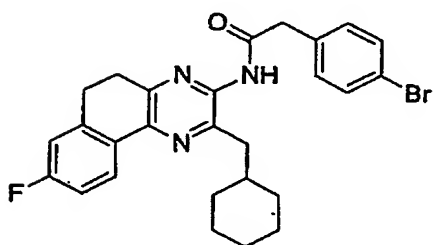
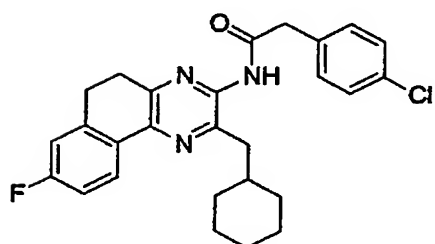
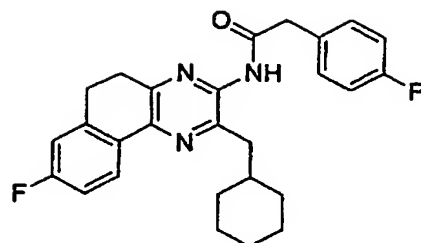
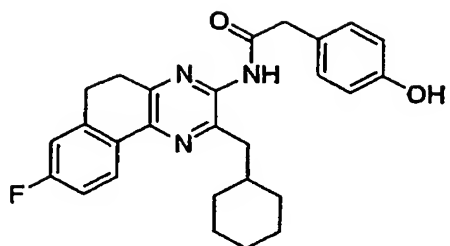
【0365】

【化 266】



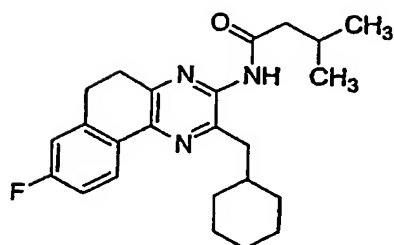
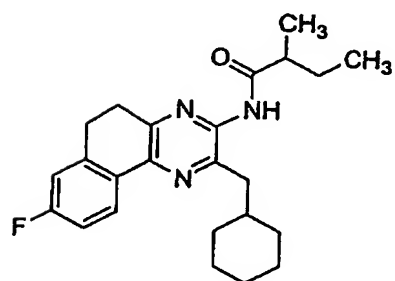
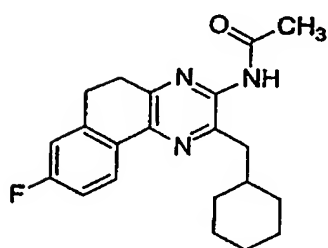
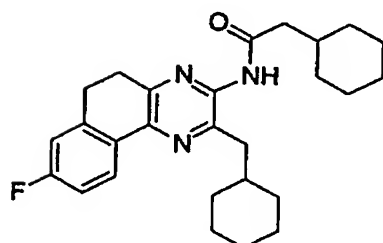
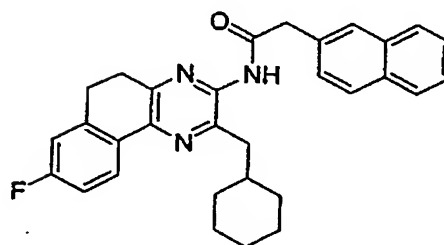
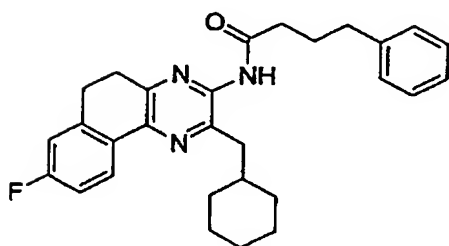
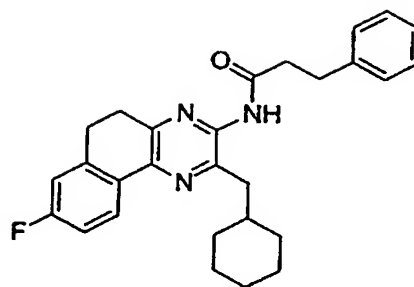
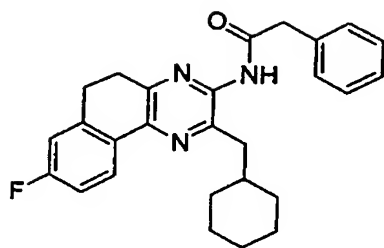
【0366】

【化 267】



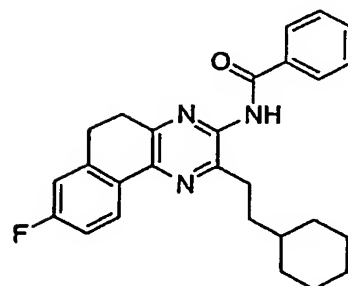
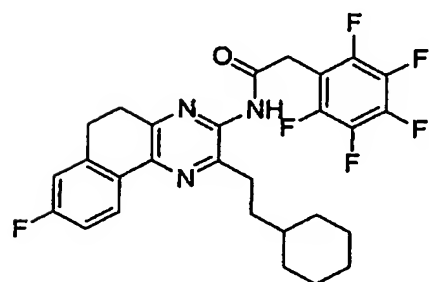
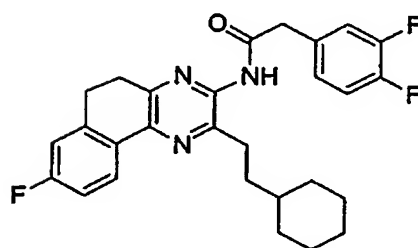
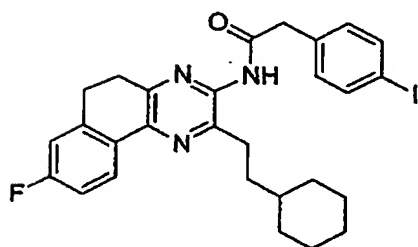
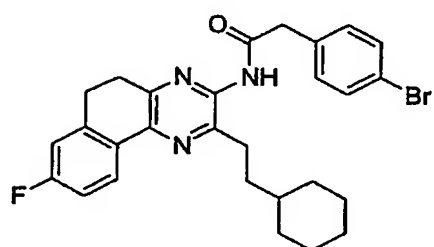
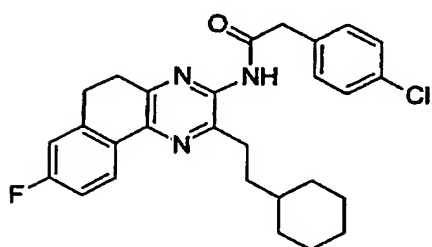
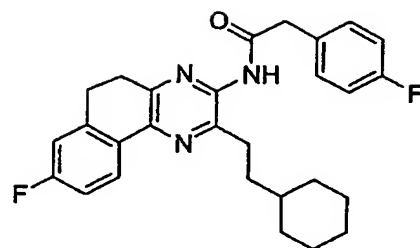
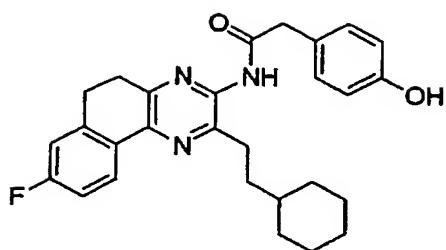
【0367】

【化 268】



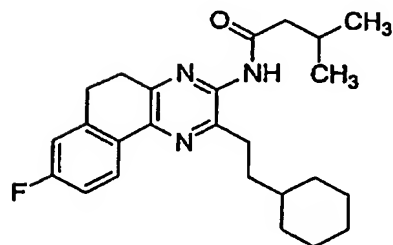
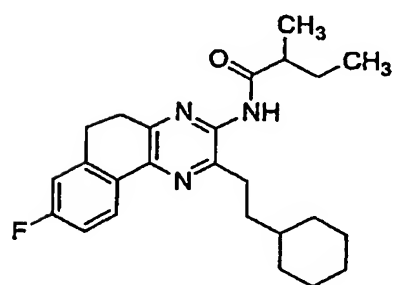
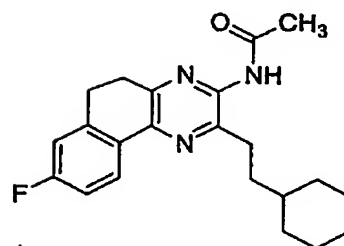
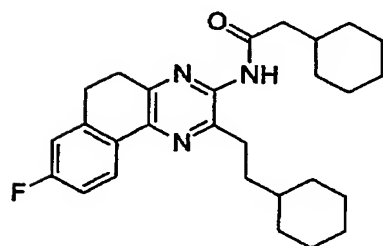
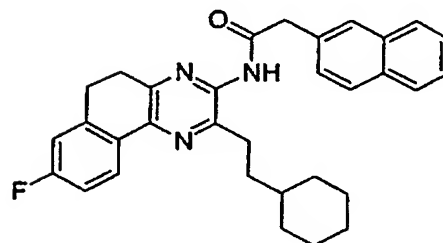
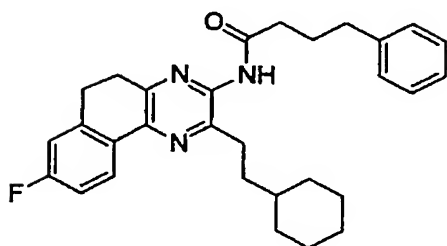
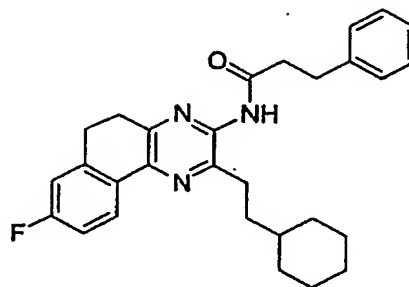
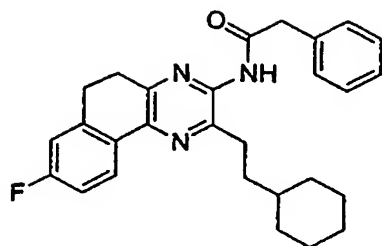
【0368】

【化 269】



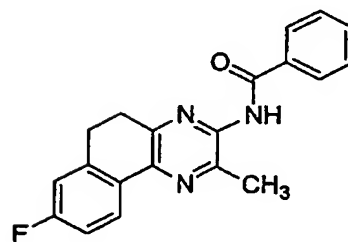
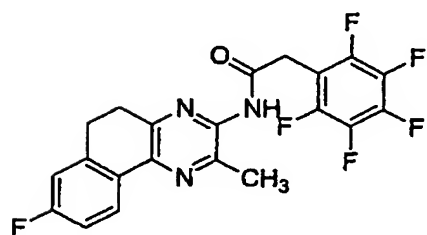
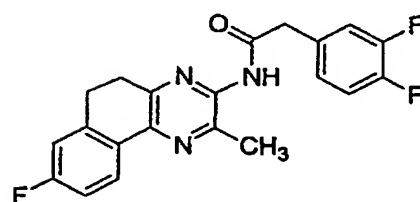
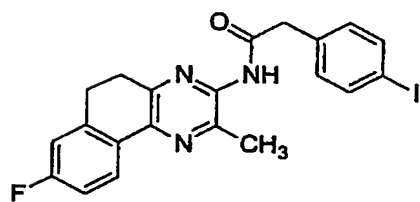
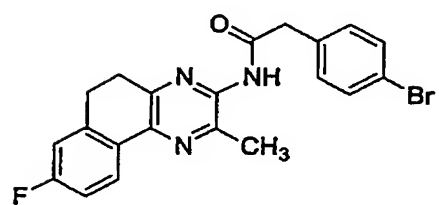
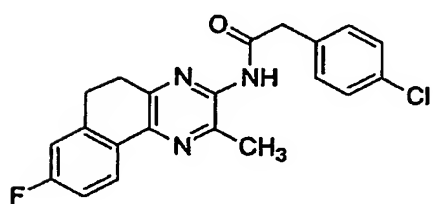
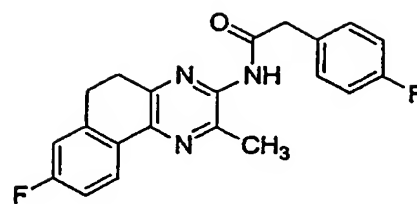
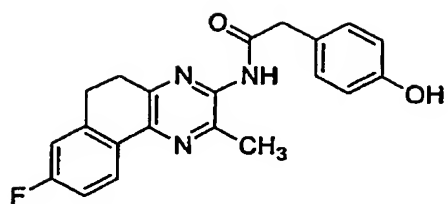
【0369】

【化 270】



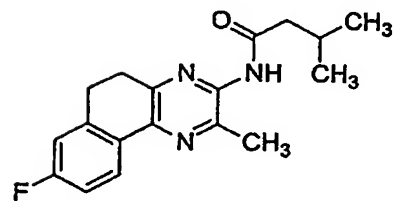
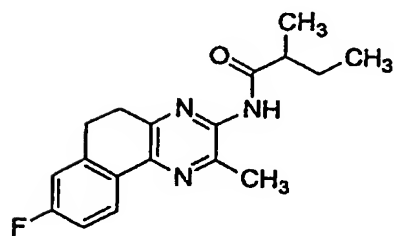
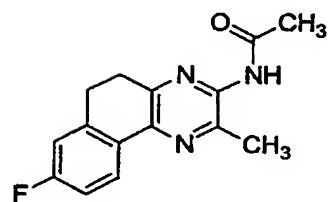
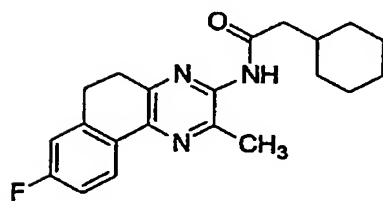
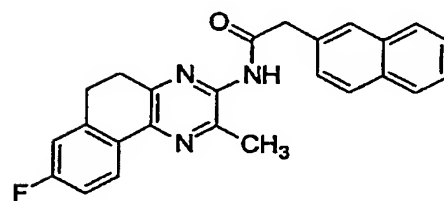
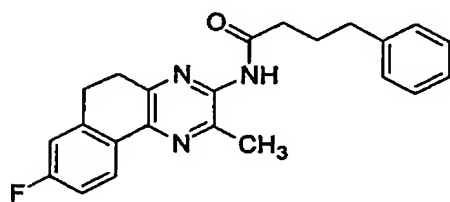
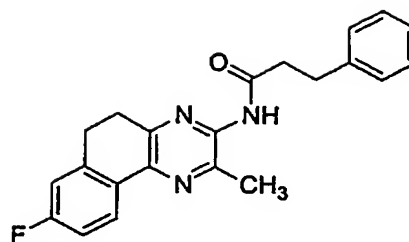
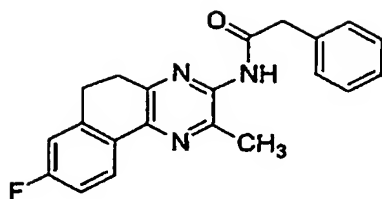
【0370】

【化 271】



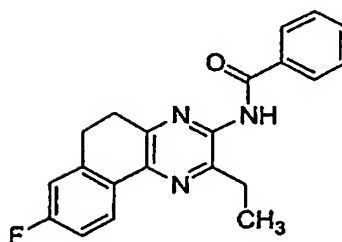
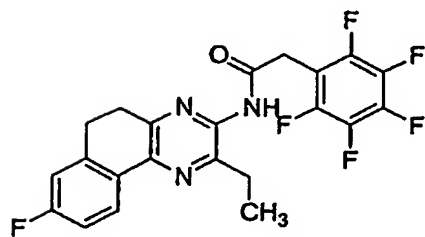
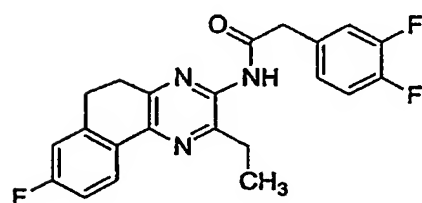
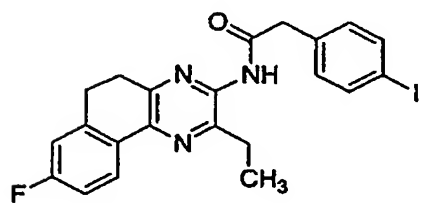
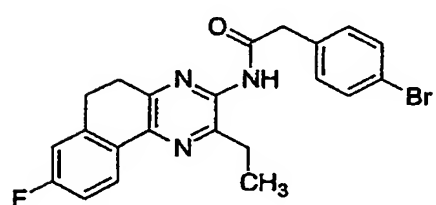
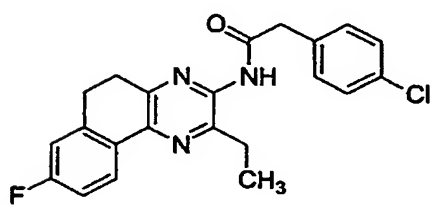
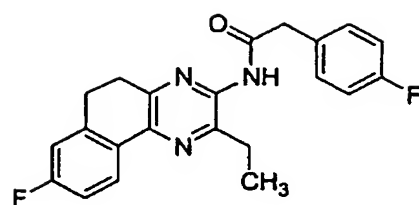
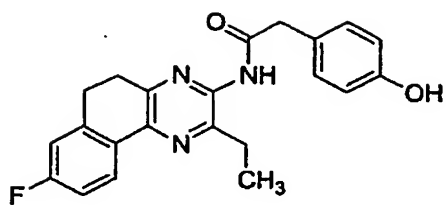
【0371】

【化 272】



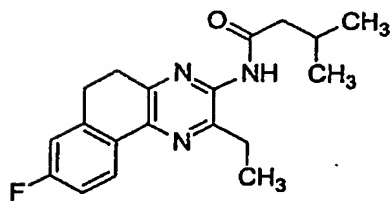
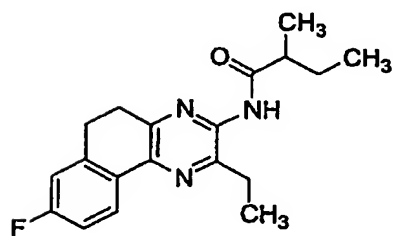
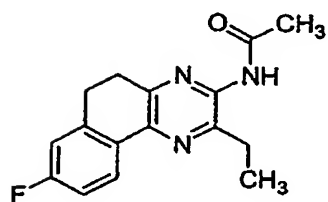
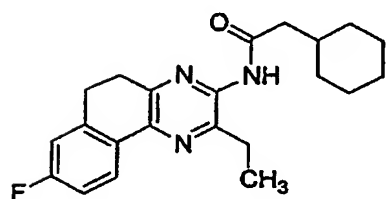
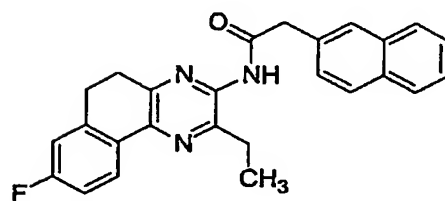
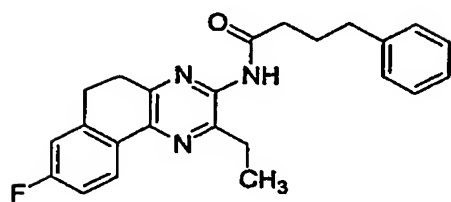
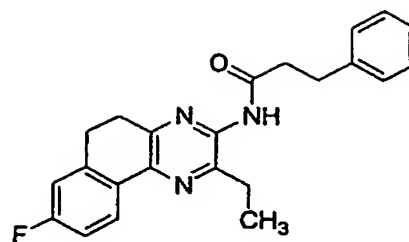
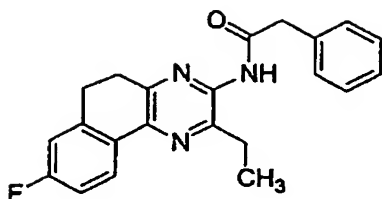
【0372】

【化 273】



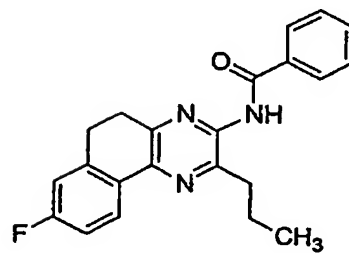
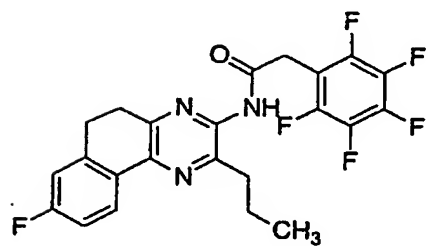
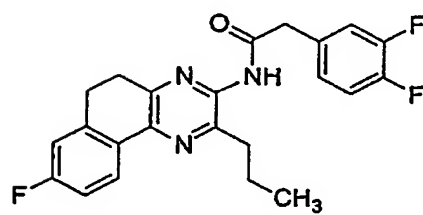
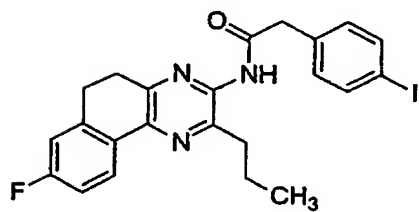
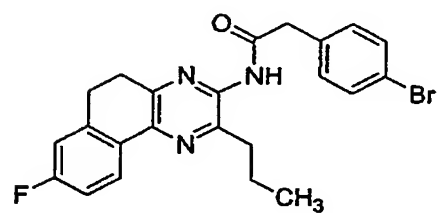
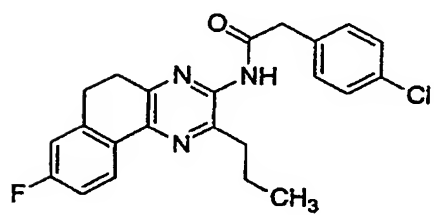
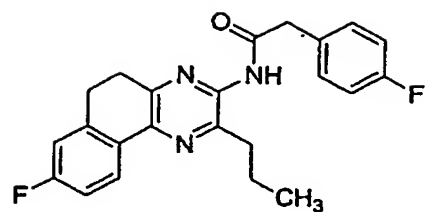
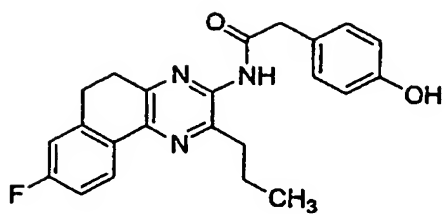
【0373】

【化 274】



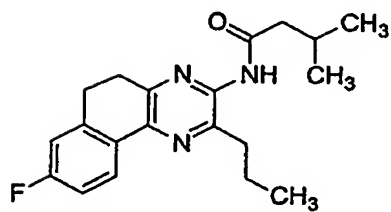
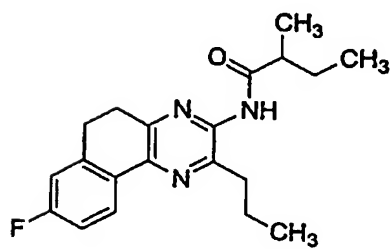
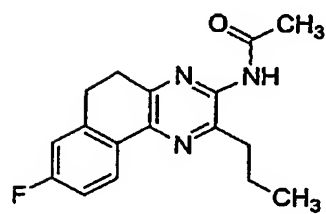
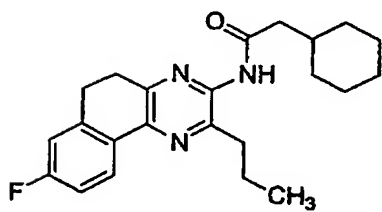
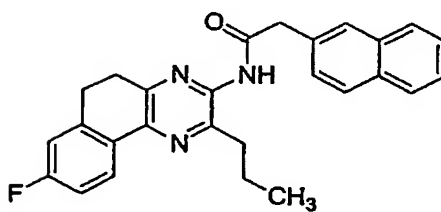
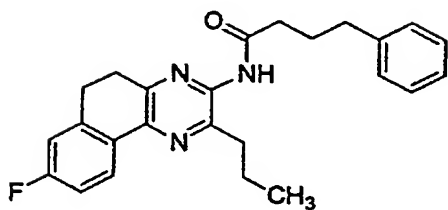
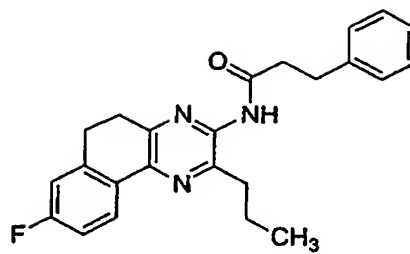
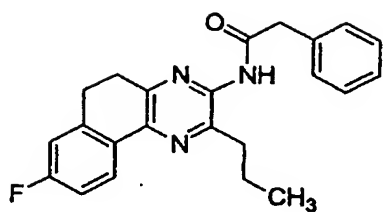
【 0 3 7 4 】

【化 275】



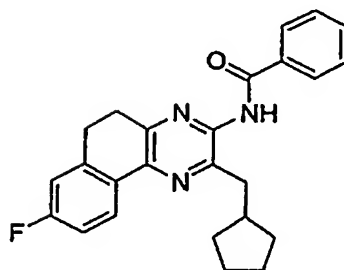
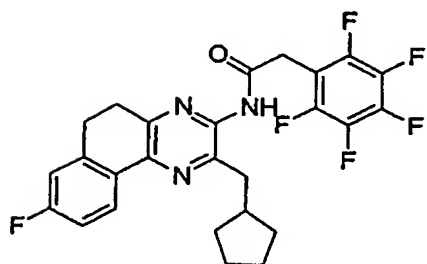
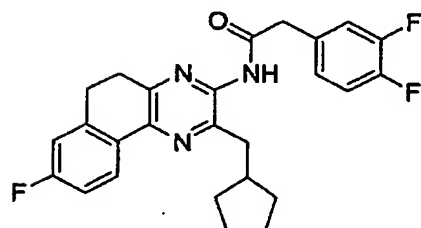
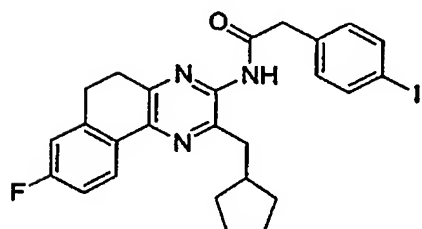
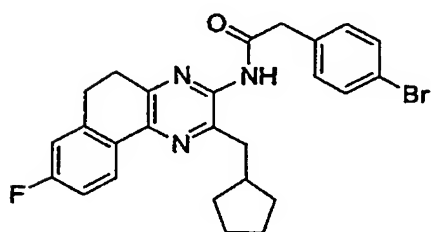
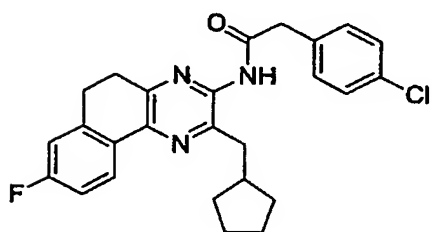
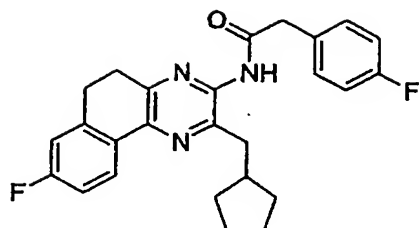
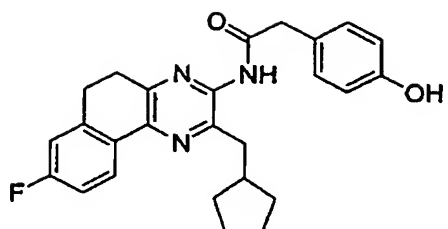
【0375】

【化 276】



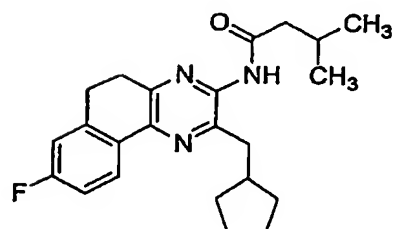
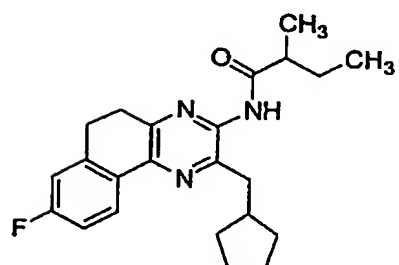
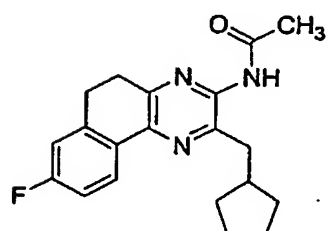
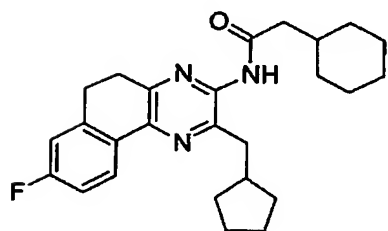
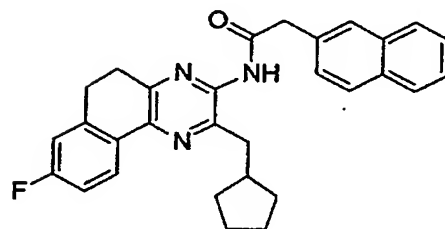
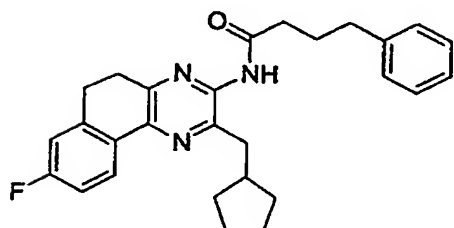
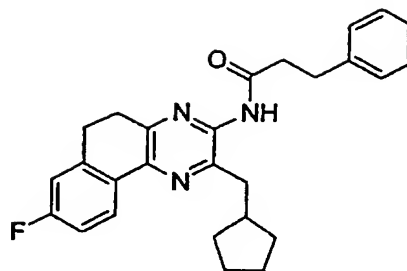
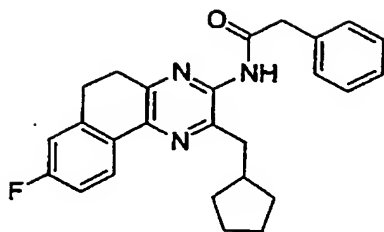
【0376】

【化 277】



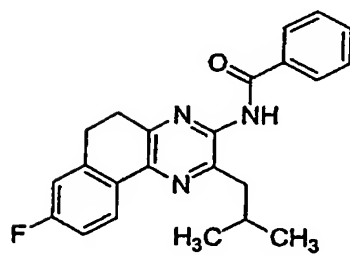
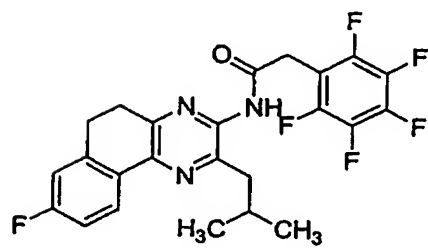
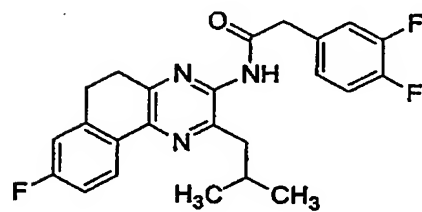
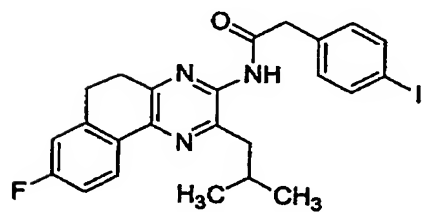
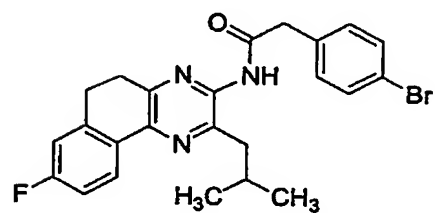
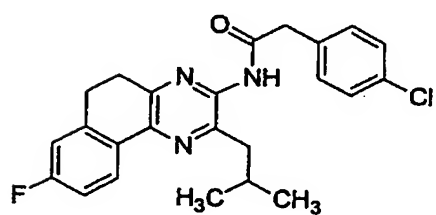
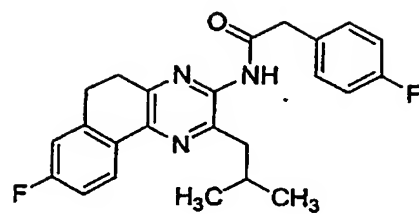
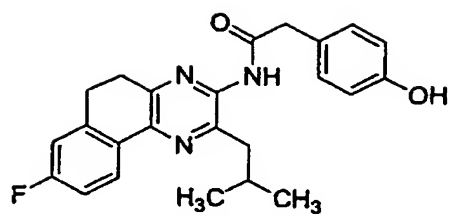
【0377】

【化 278】



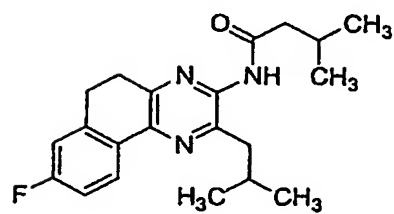
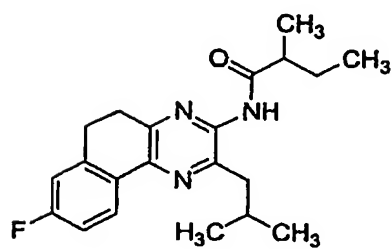
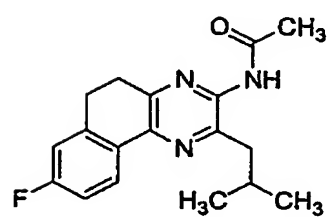
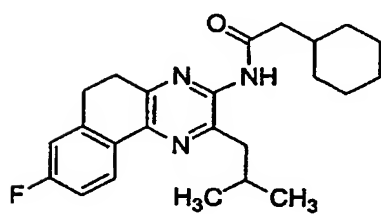
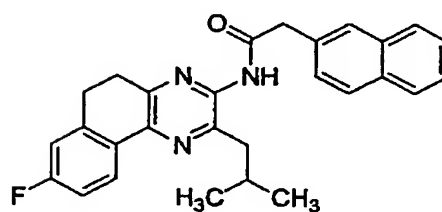
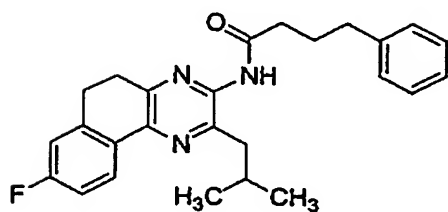
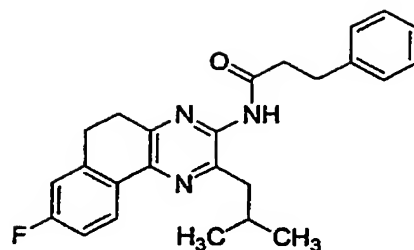
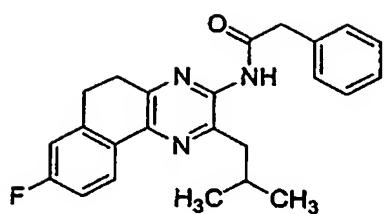
【0378】

【化 279】



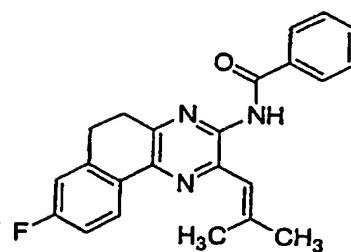
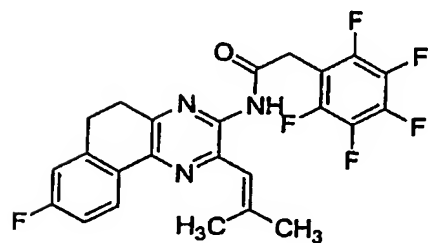
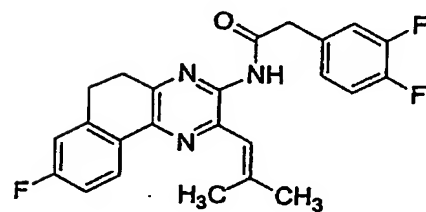
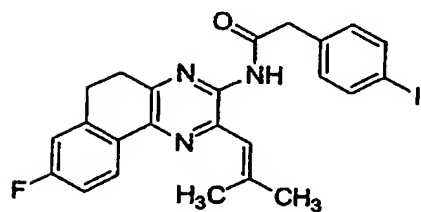
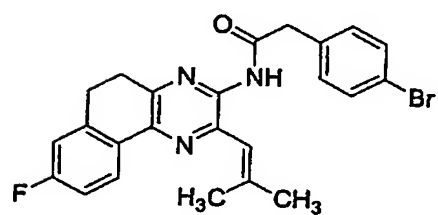
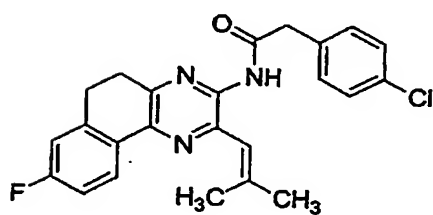
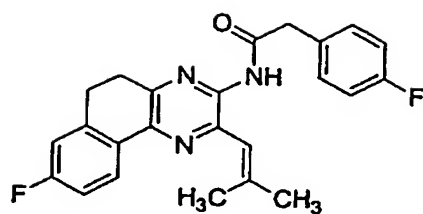
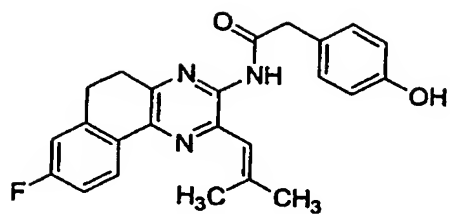
【0379】

【化 280】



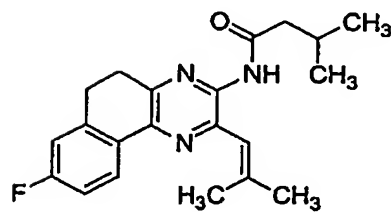
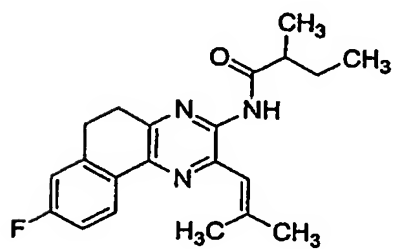
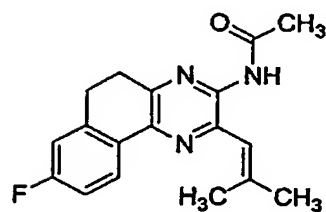
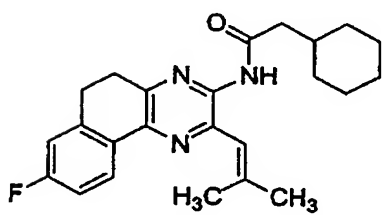
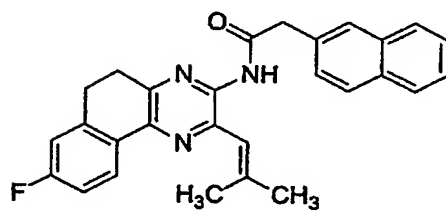
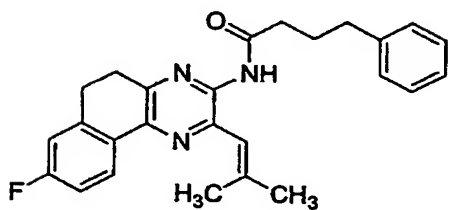
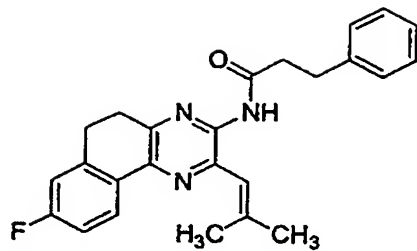
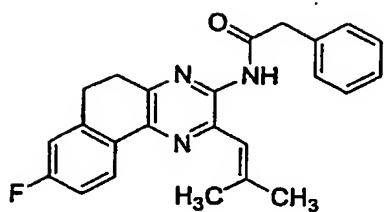
【0380】

【化 281】



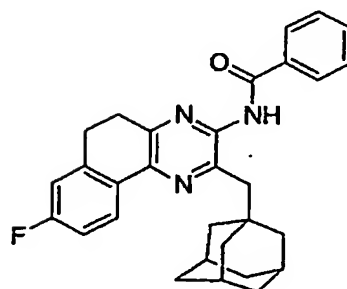
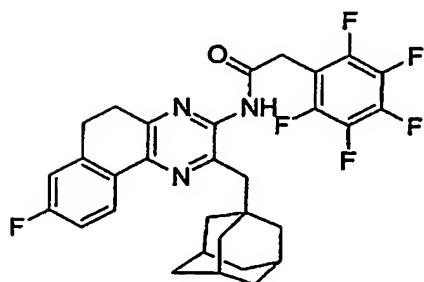
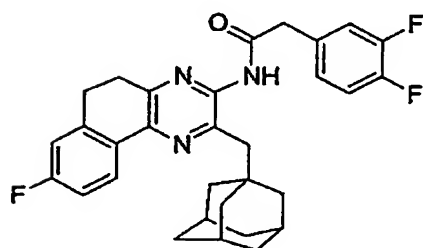
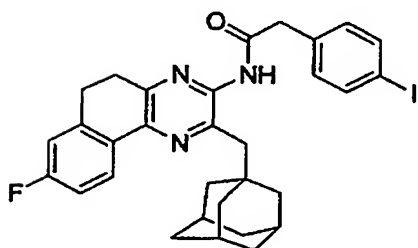
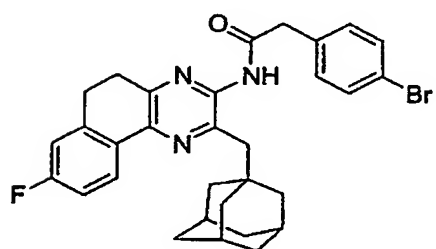
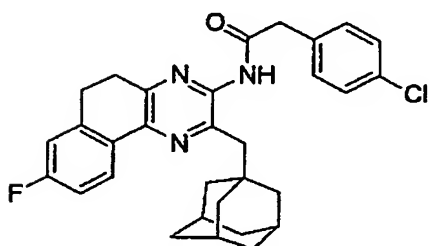
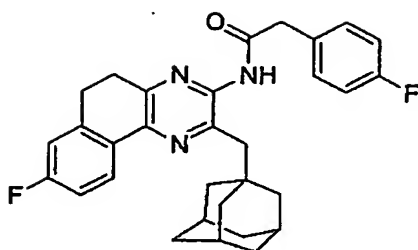
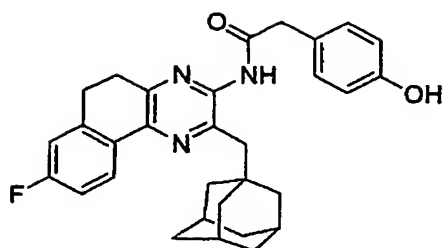
【0381】

【化 282】



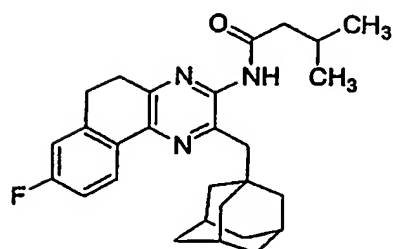
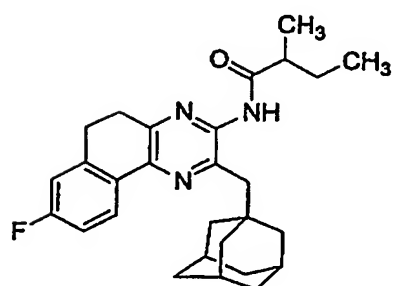
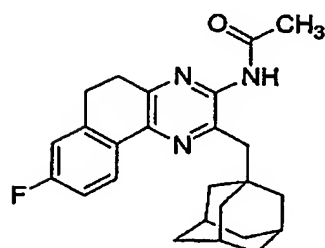
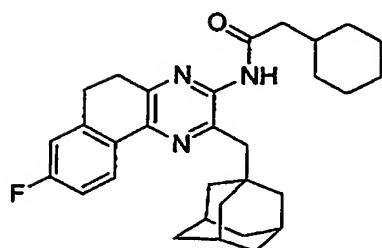
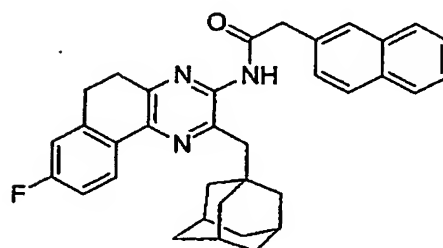
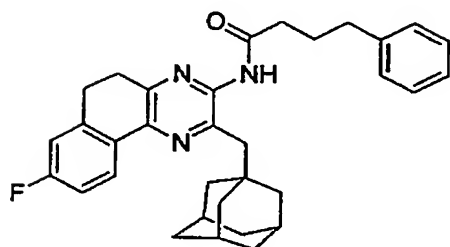
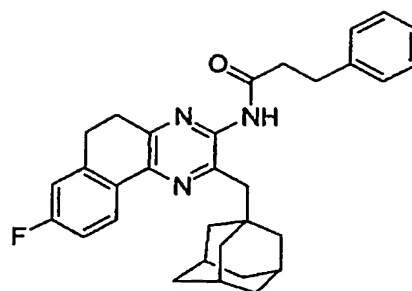
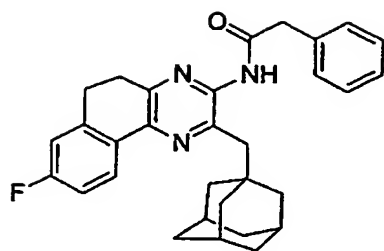
【0382】

【化 283】



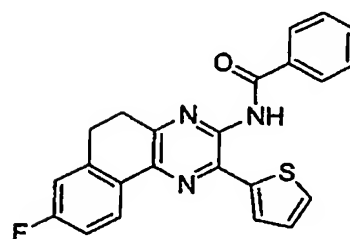
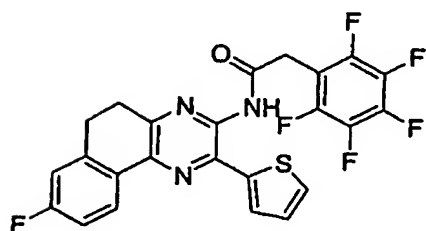
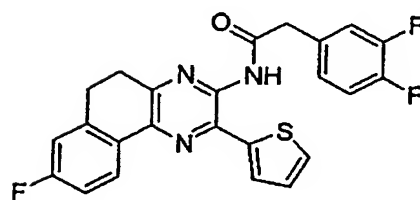
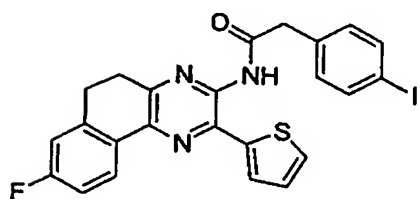
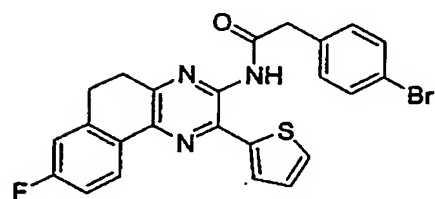
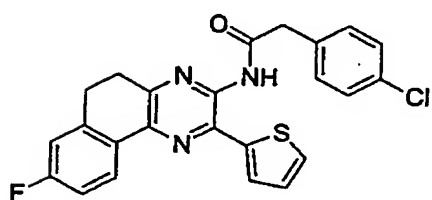
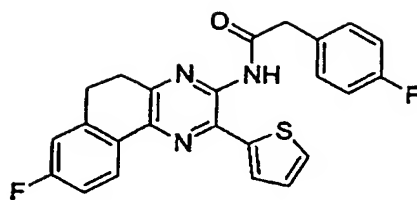
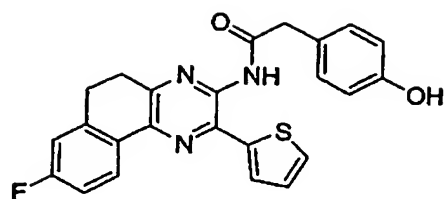
【0383】

【化 284】



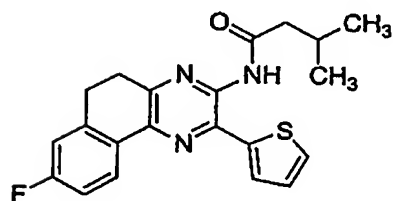
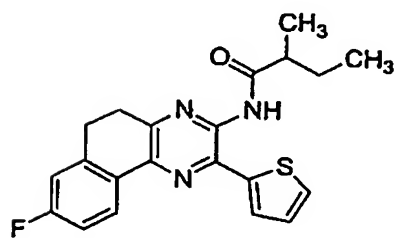
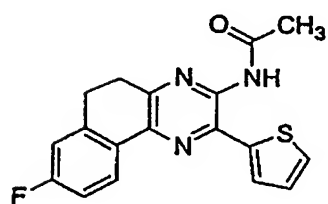
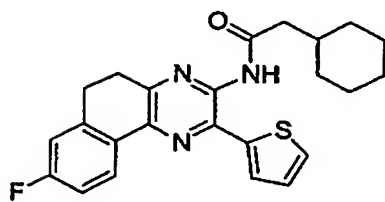
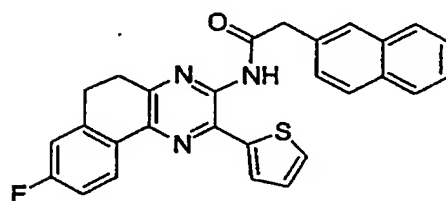
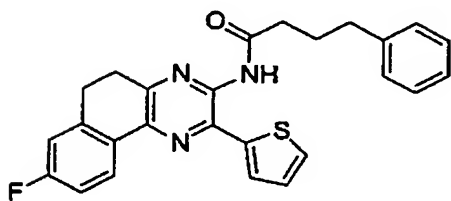
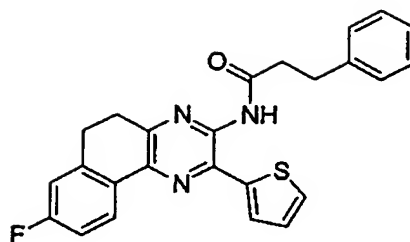
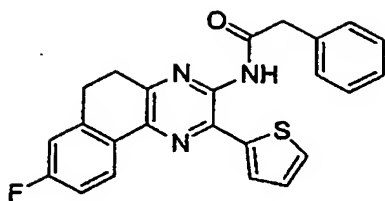
【0384】

【化 285】



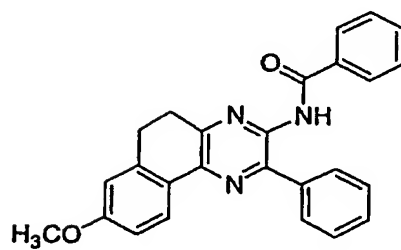
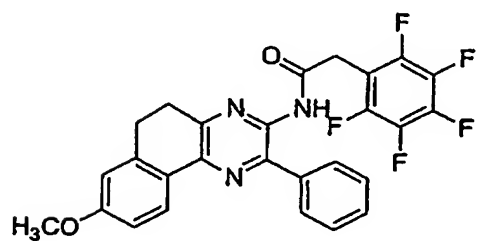
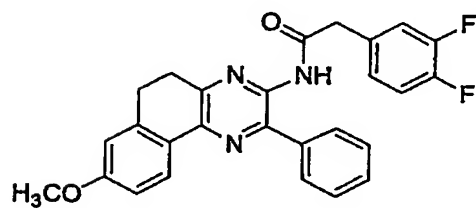
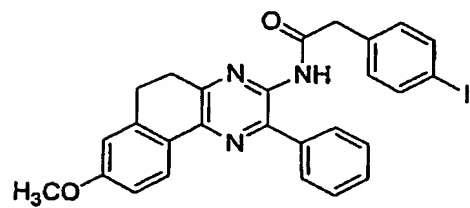
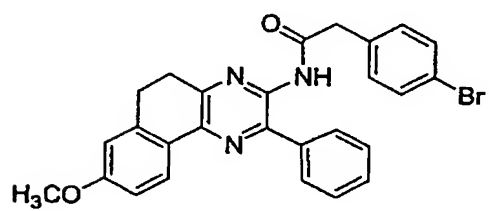
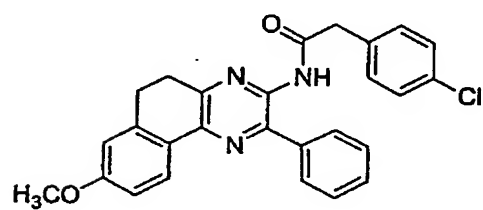
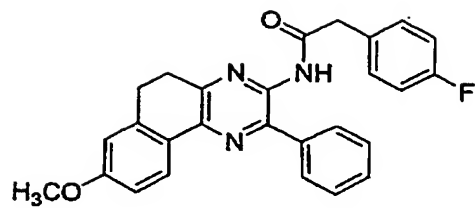
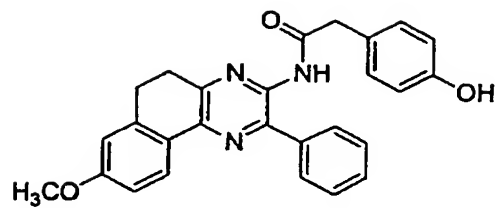
【0385】

【化 286】



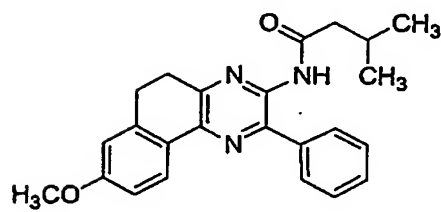
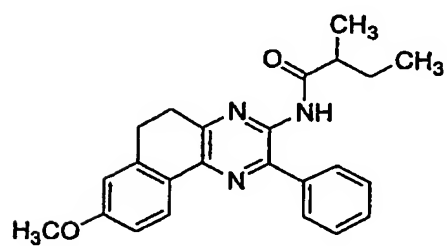
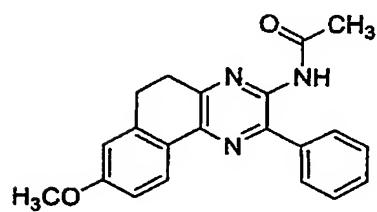
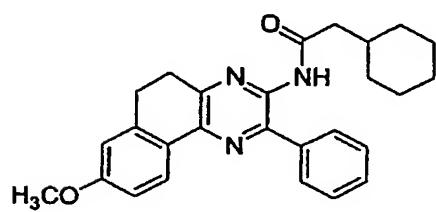
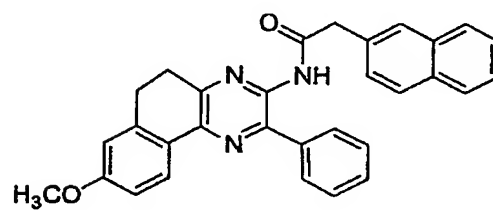
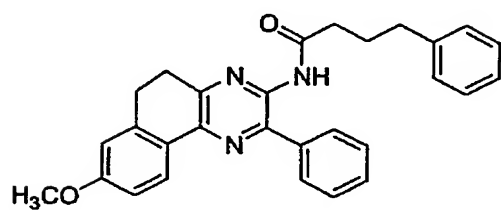
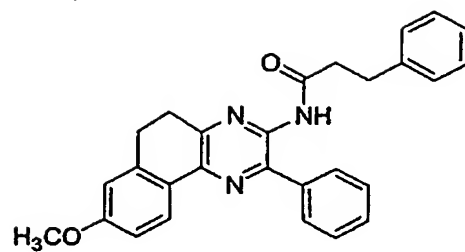
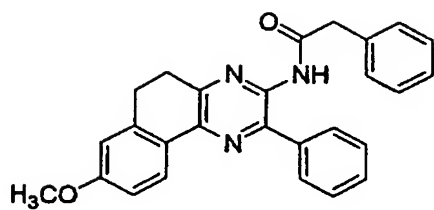
【0386】

【化 287】



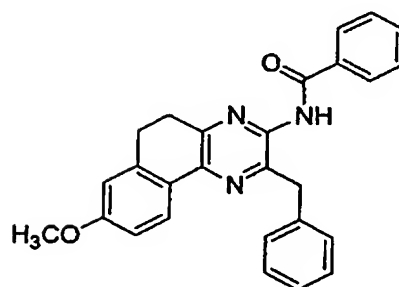
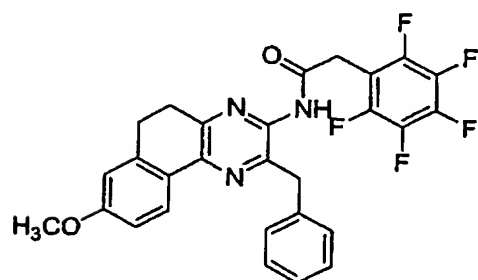
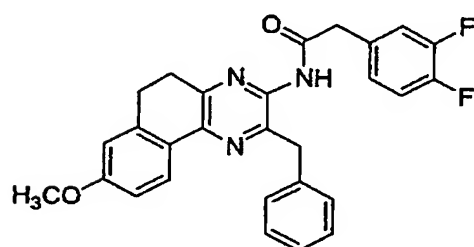
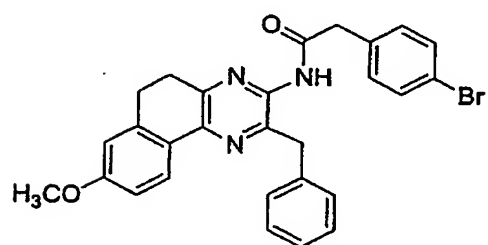
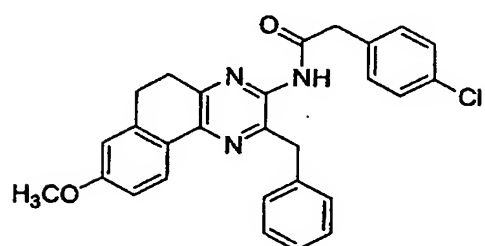
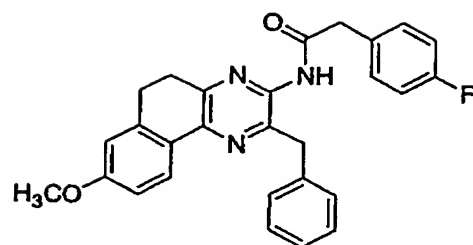
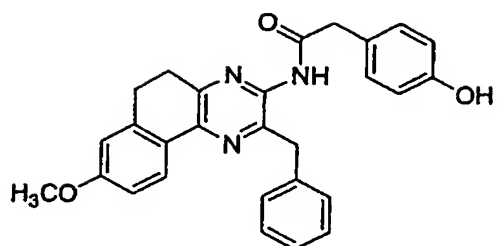
【0387】

【化 288】



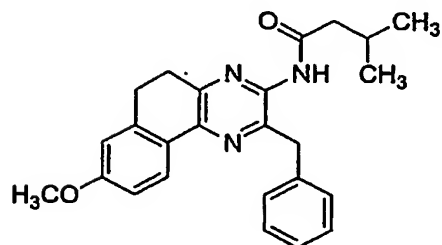
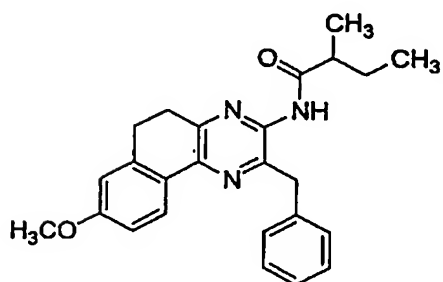
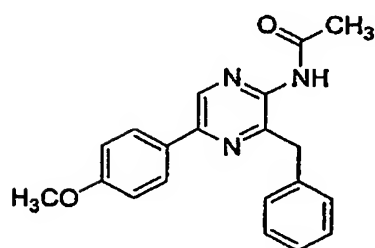
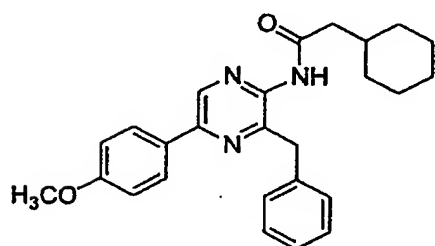
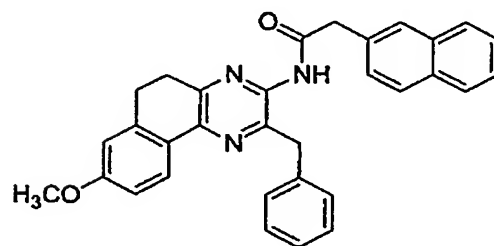
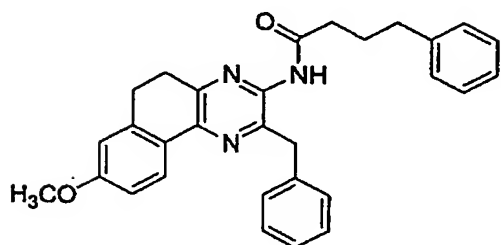
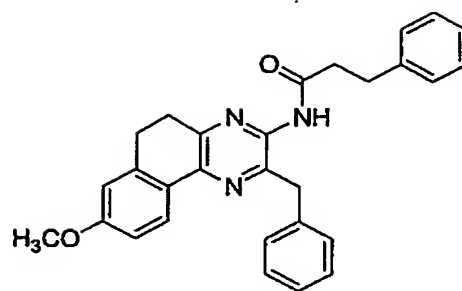
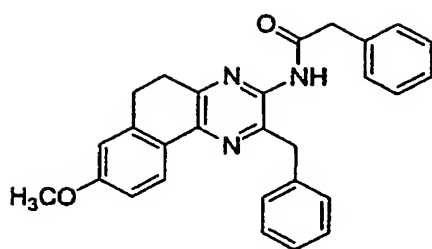
【 0388】

【化 289】



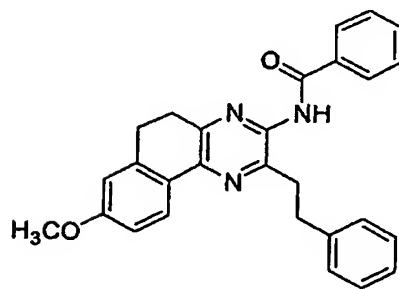
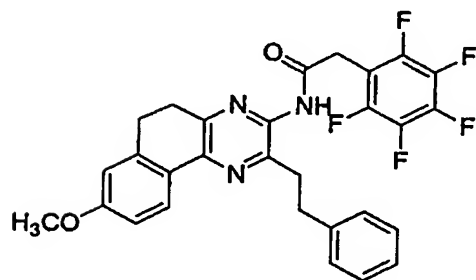
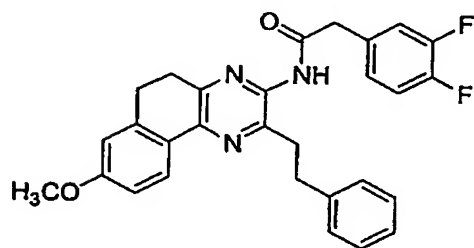
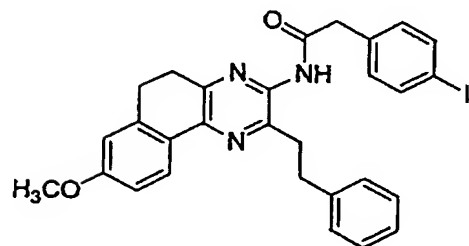
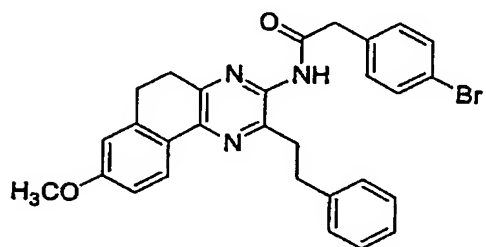
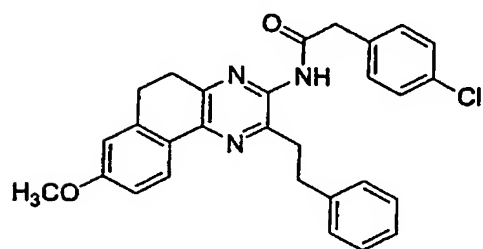
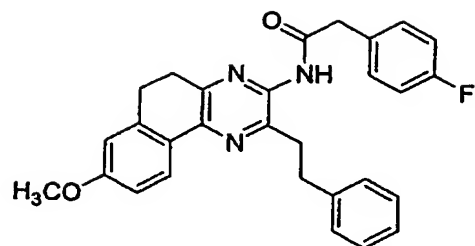
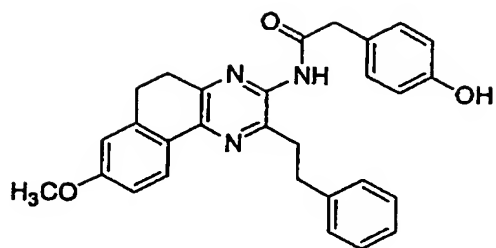
【0389】

【化 290】



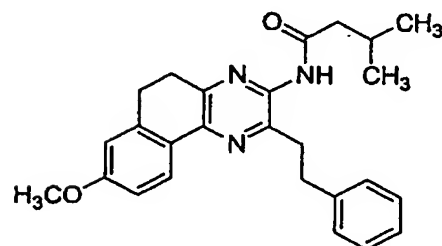
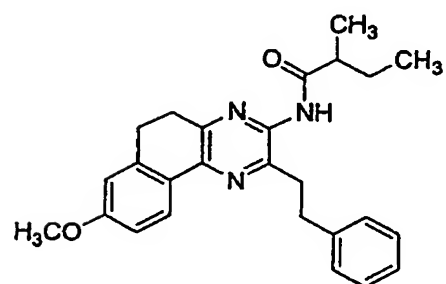
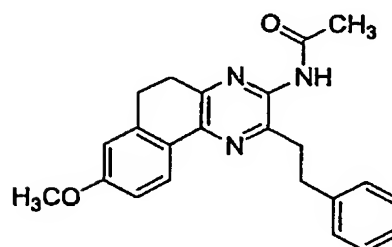
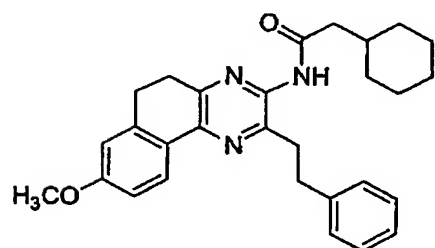
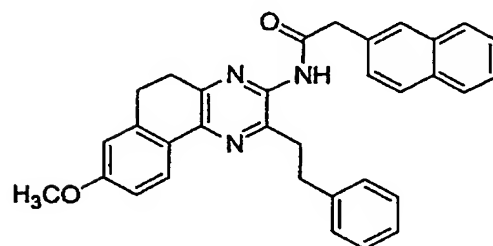
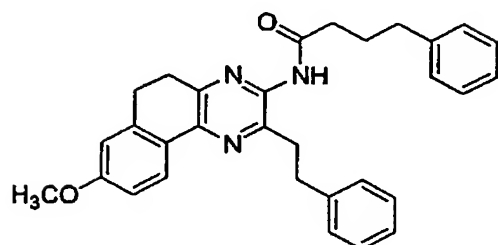
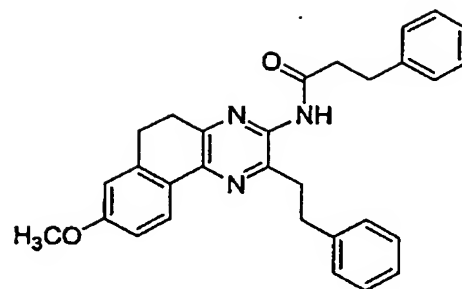
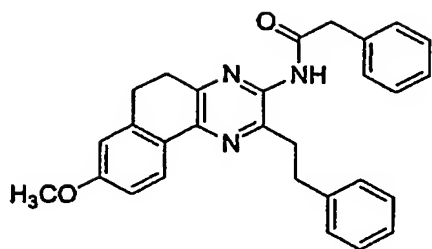
【0390】

【化 291】



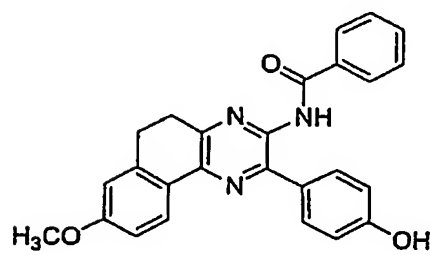
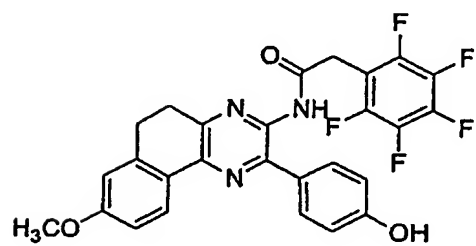
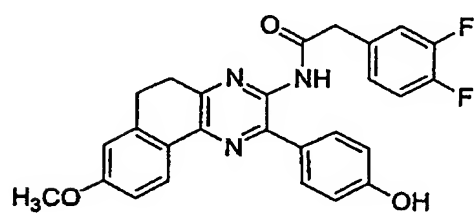
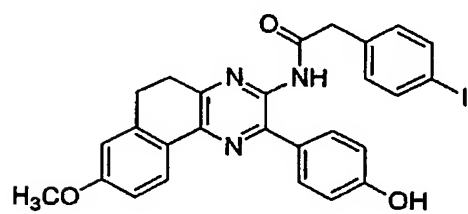
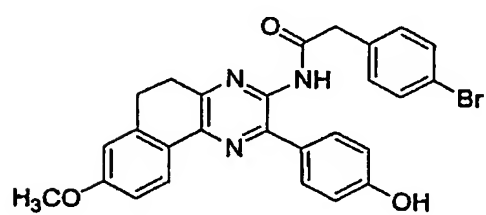
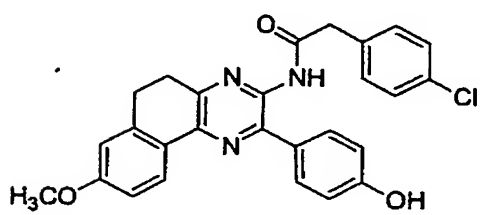
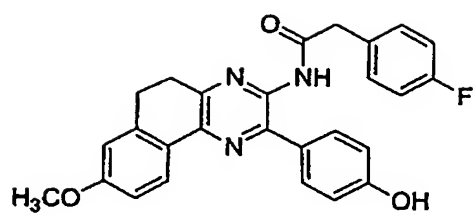
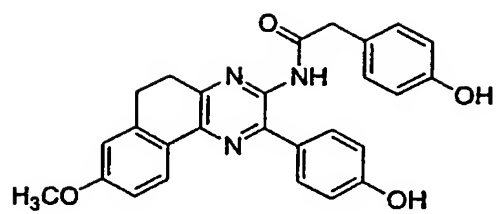
【0391】

【化 292】



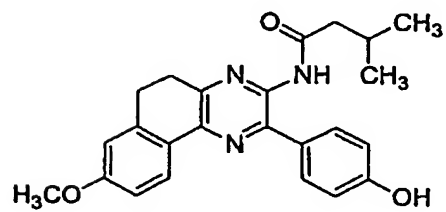
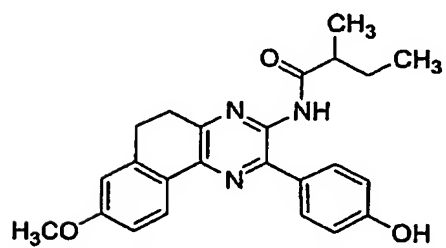
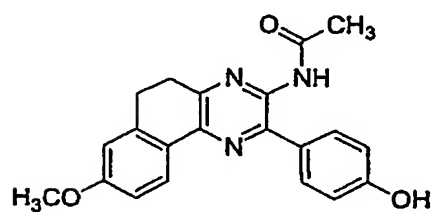
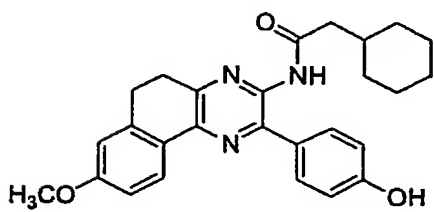
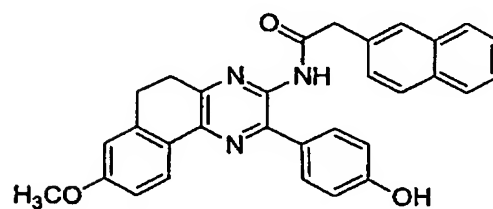
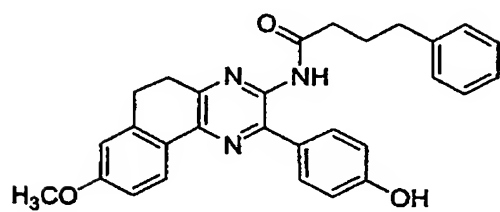
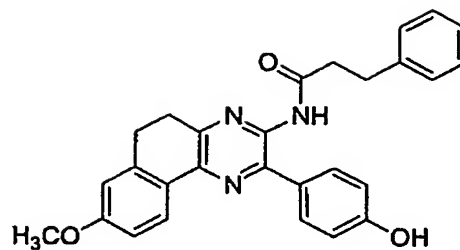
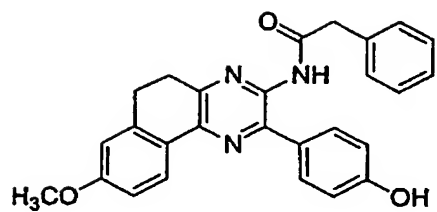
【0392】

【化 293】



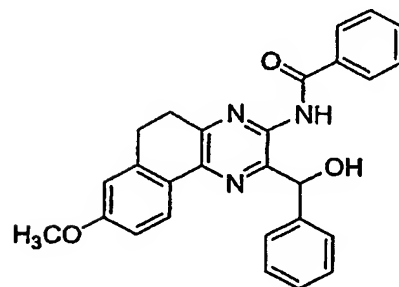
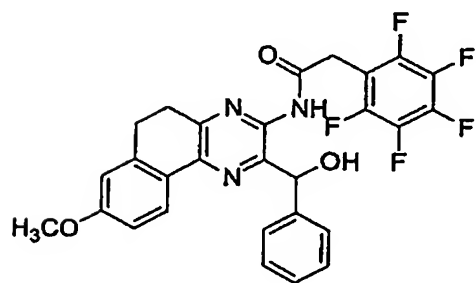
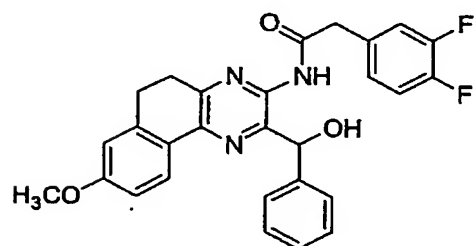
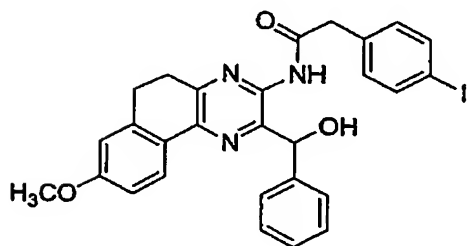
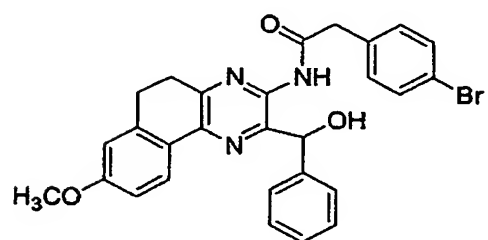
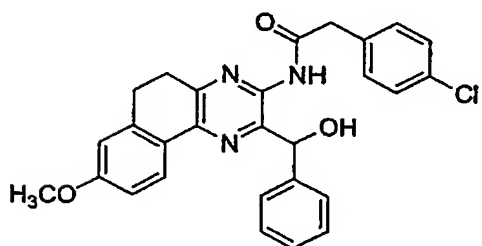
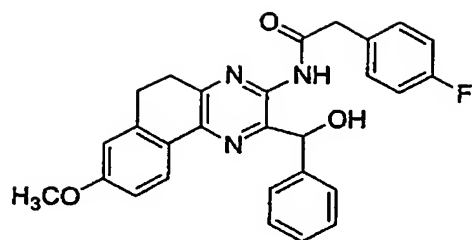
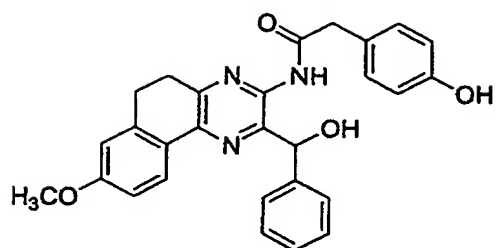
【0393】

【化 294】



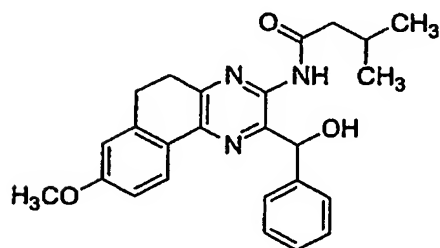
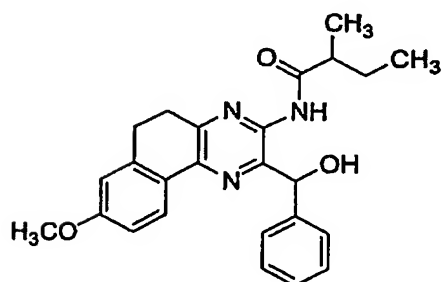
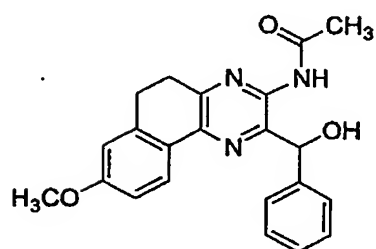
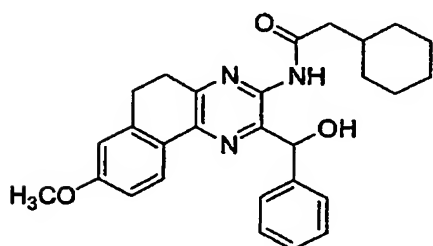
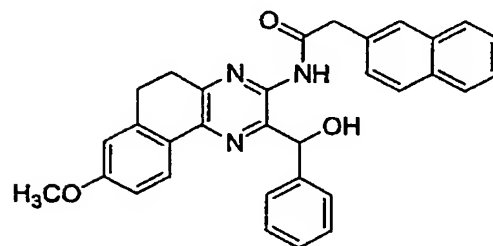
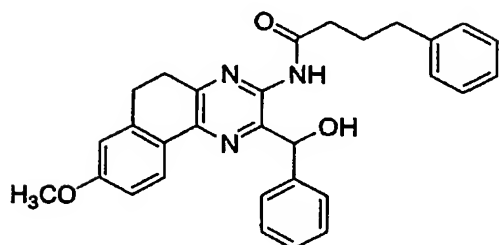
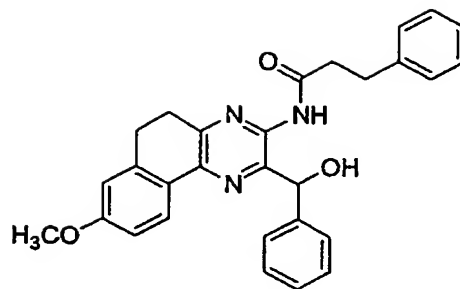
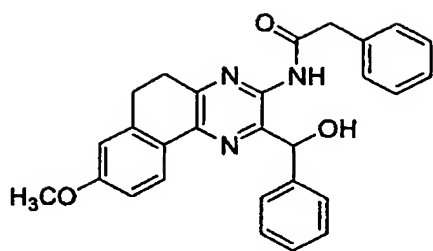
【0394】

【化 2 9 5】



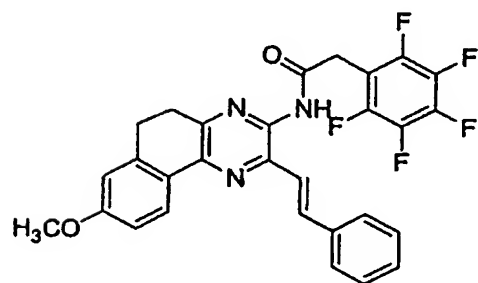
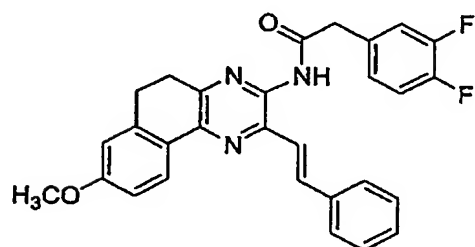
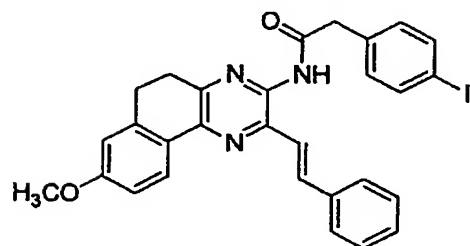
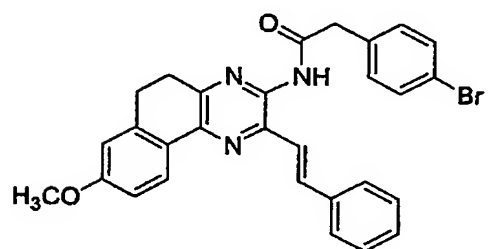
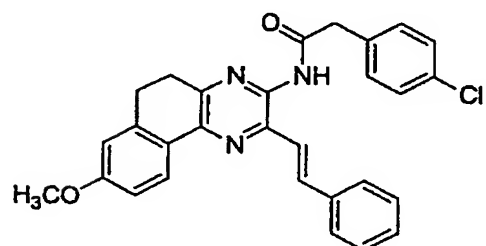
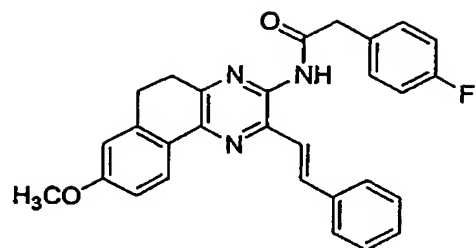
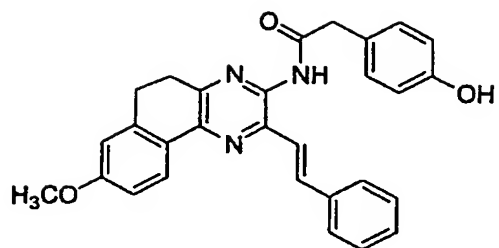
【 0 3 9 5 】

【化 296】

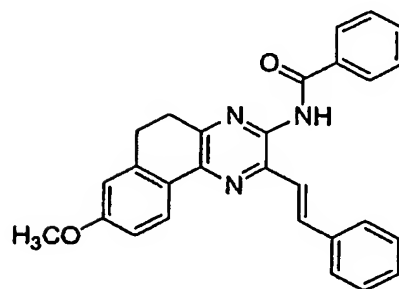


【0396】

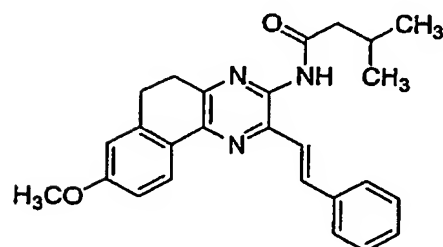
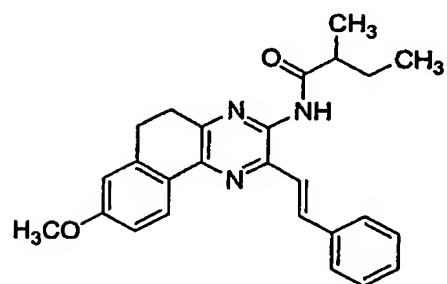
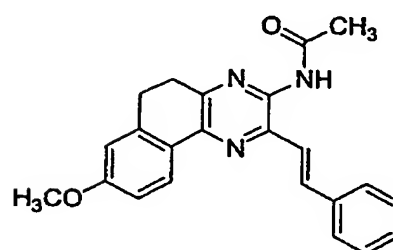
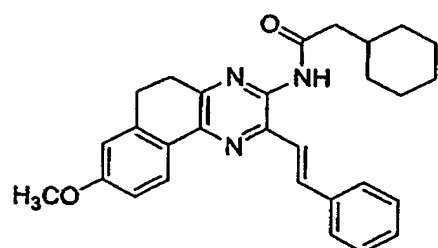
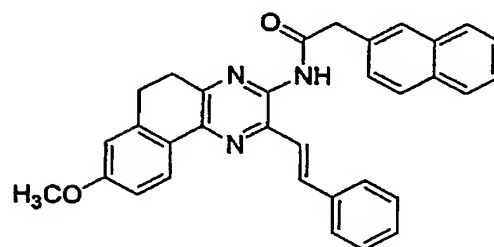
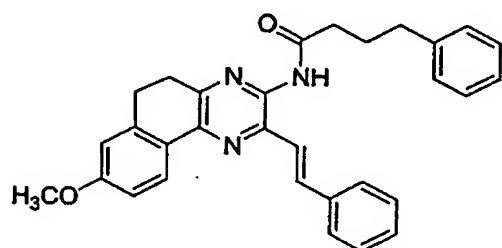
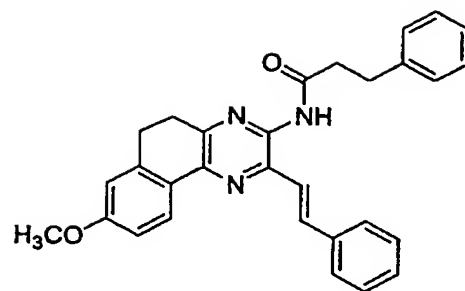
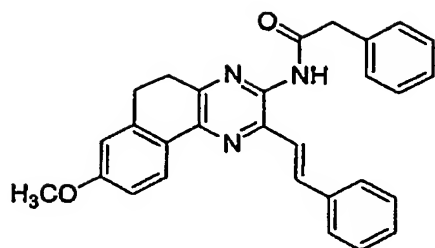
【化 297】



【 0397】

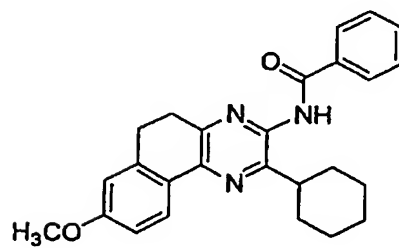
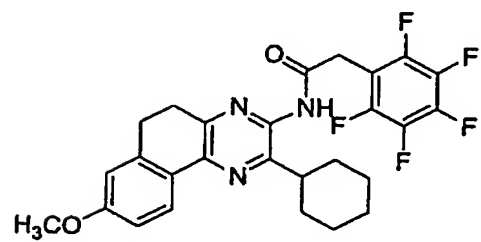
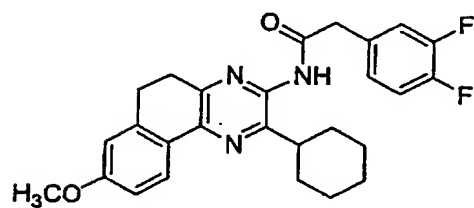
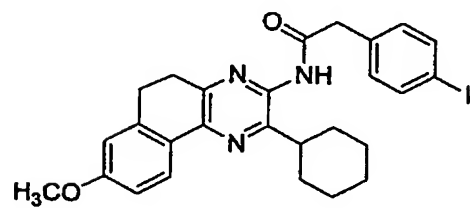
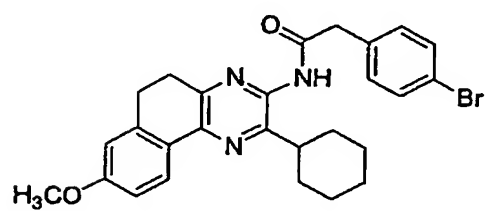
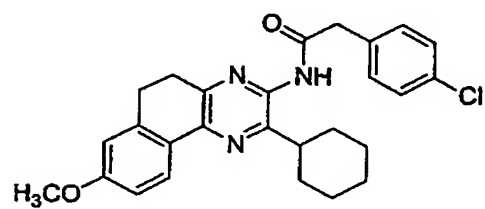
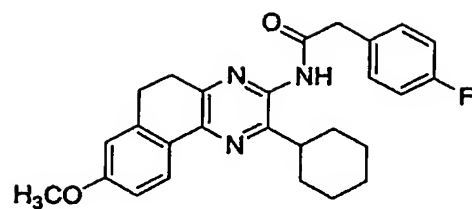
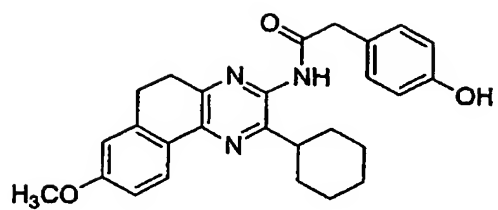


【化 298】



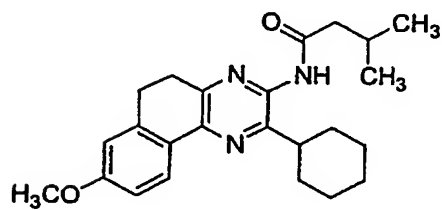
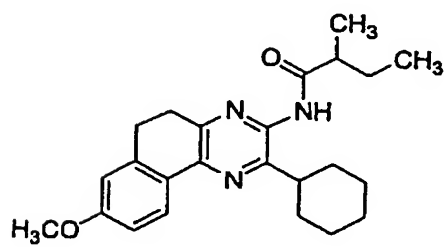
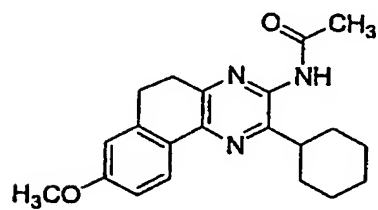
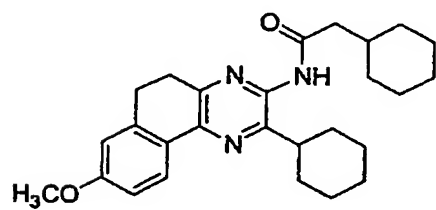
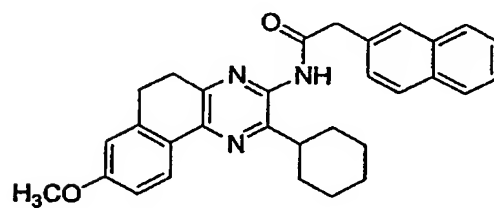
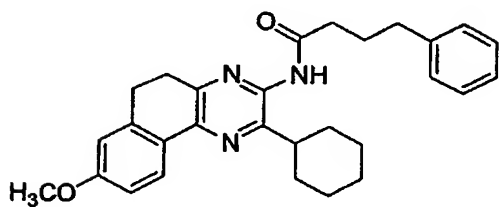
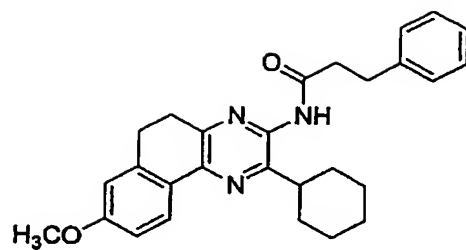
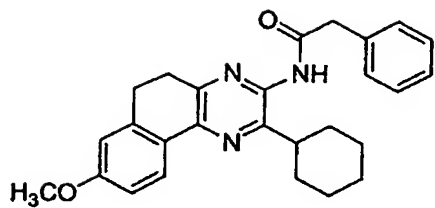
【0398】

【化 299】



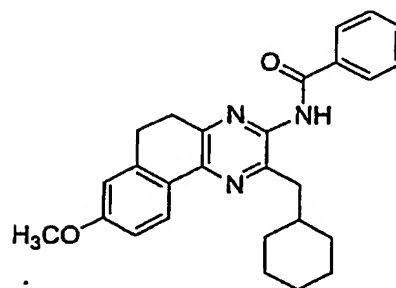
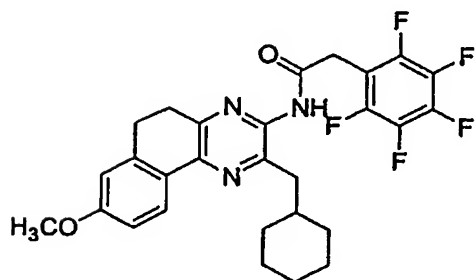
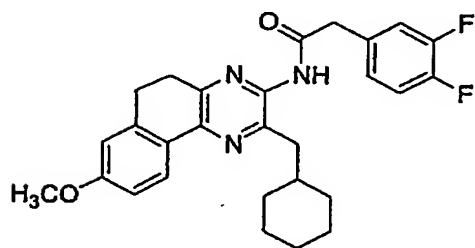
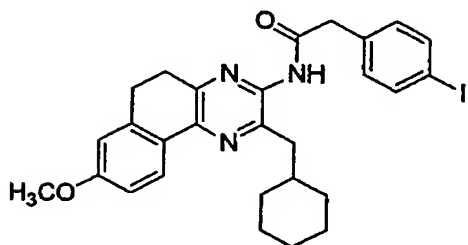
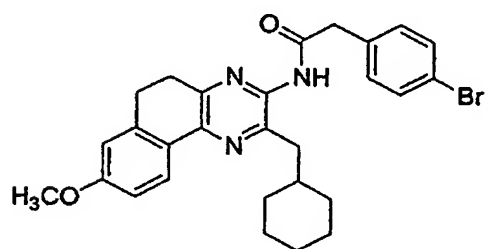
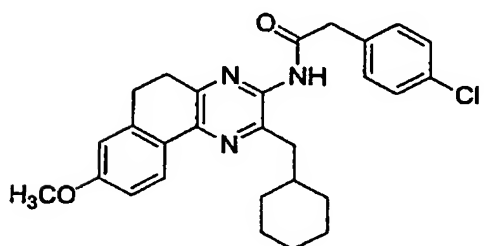
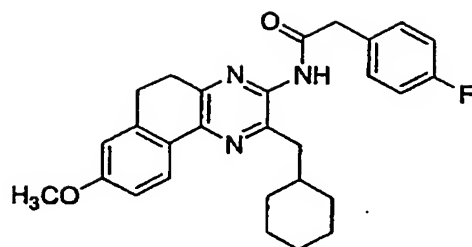
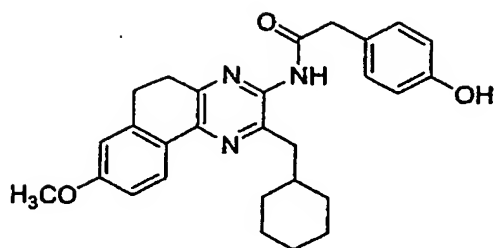
【0399】

【化300】



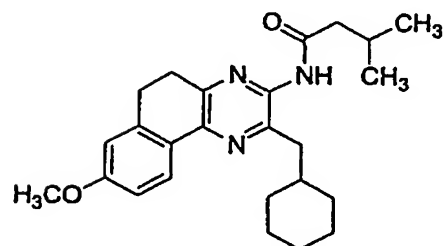
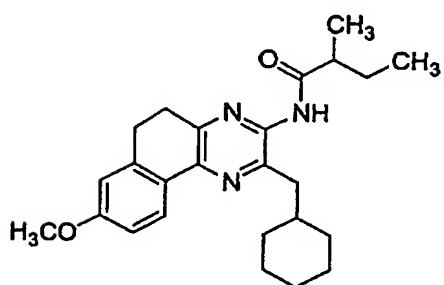
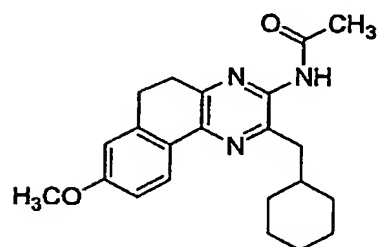
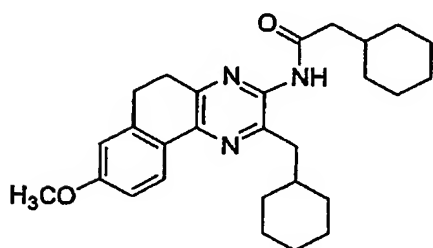
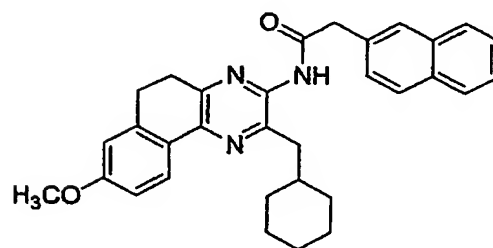
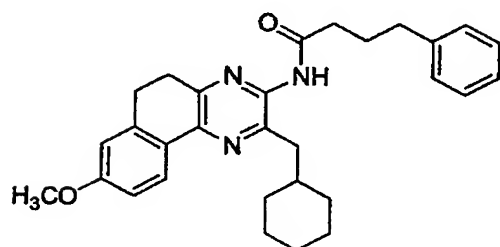
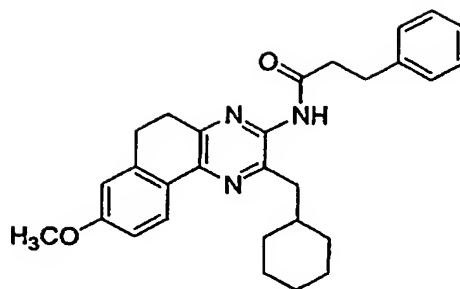
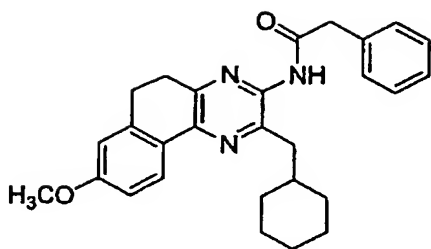
【0400】

【化 301】



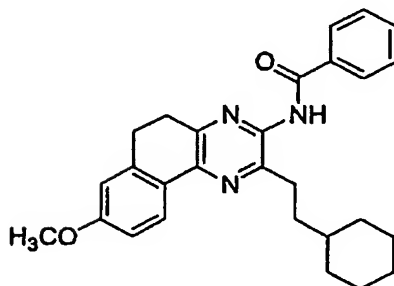
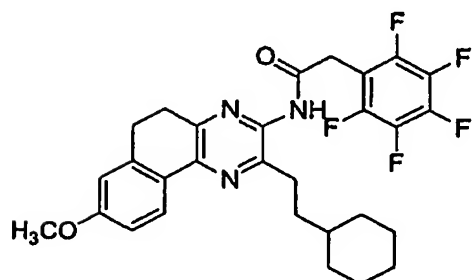
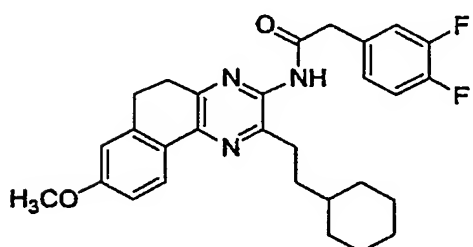
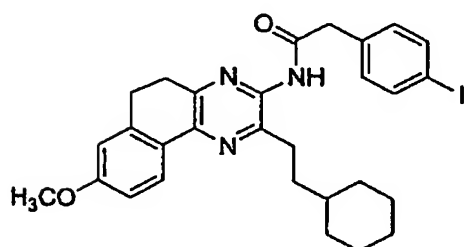
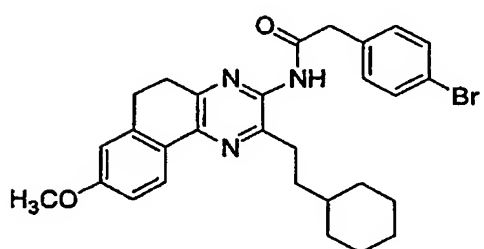
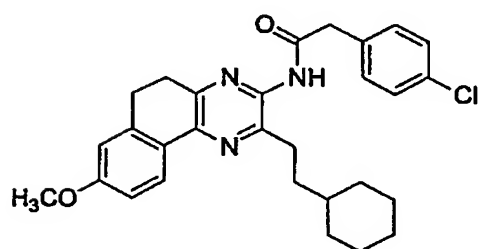
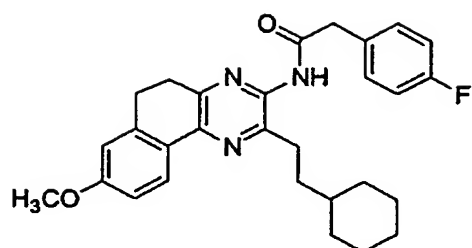
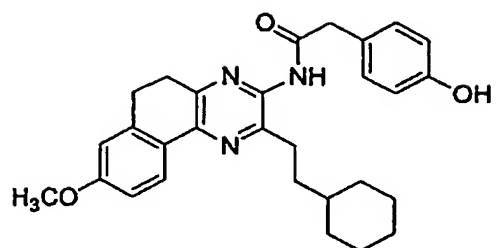
【0401】

【化 3 0 2】



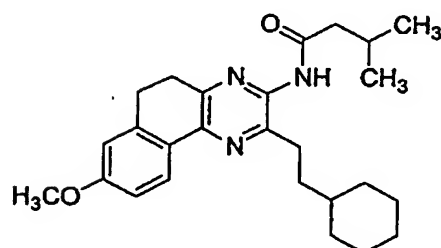
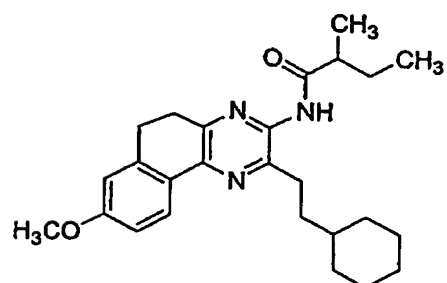
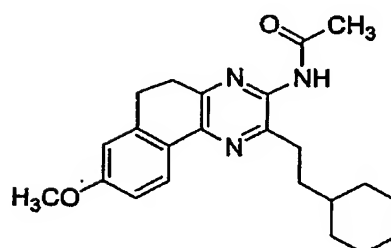
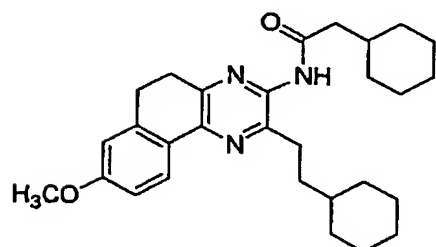
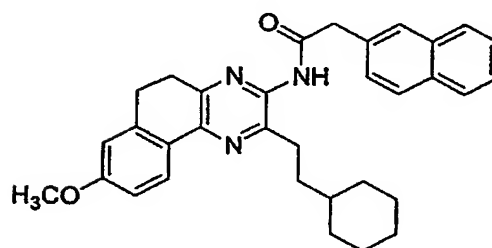
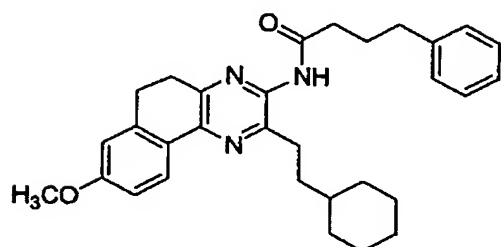
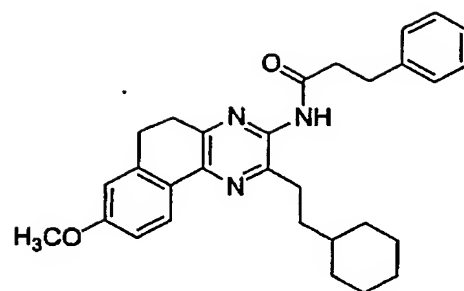
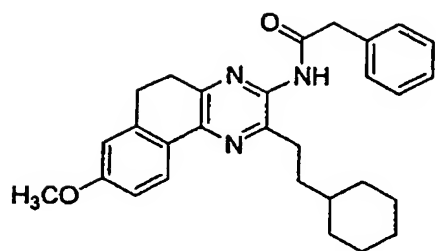
【 0 4 0 2】

【化 303】



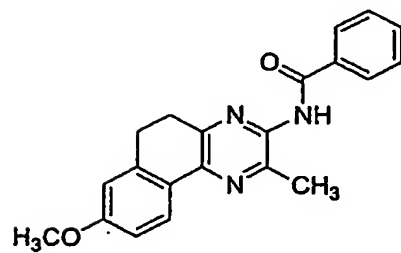
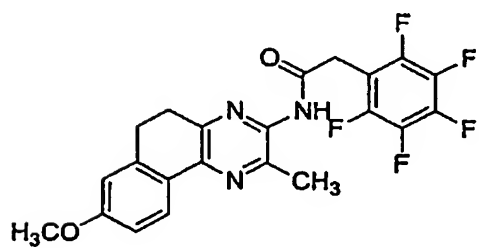
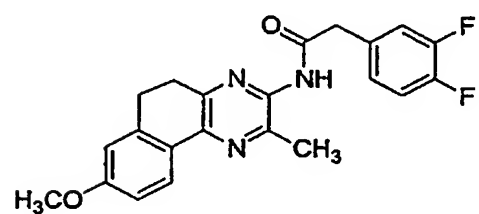
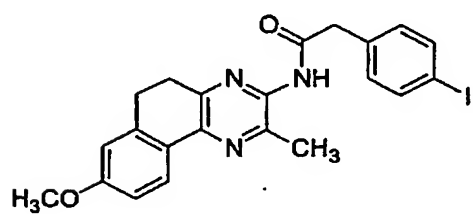
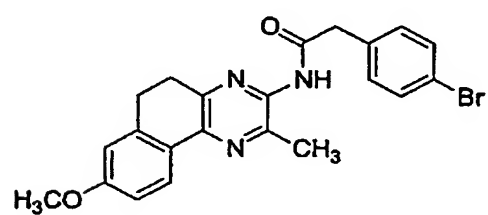
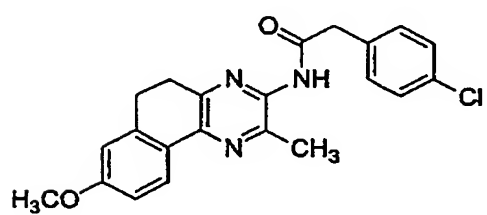
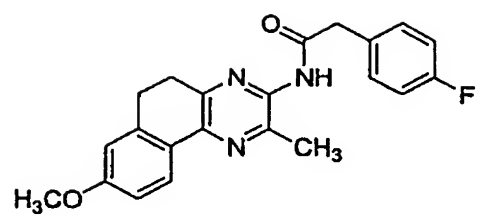
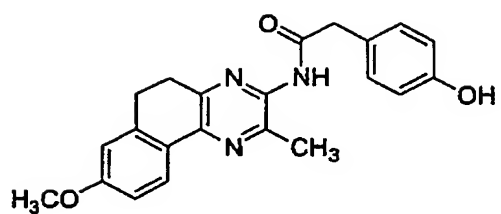
【0403】

【化 304】



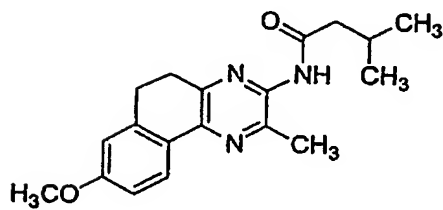
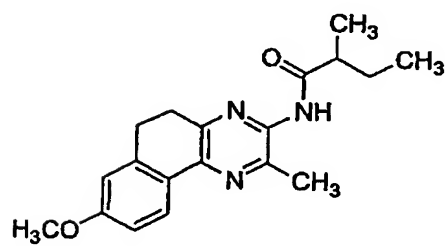
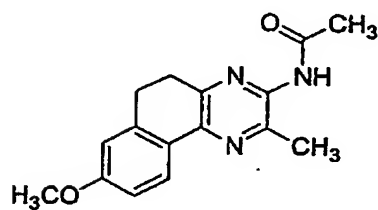
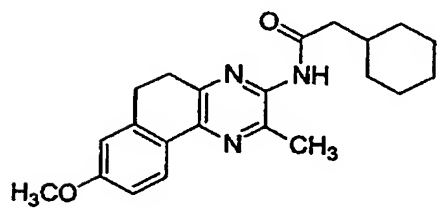
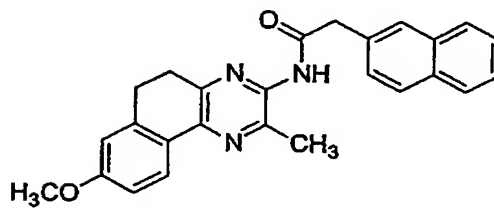
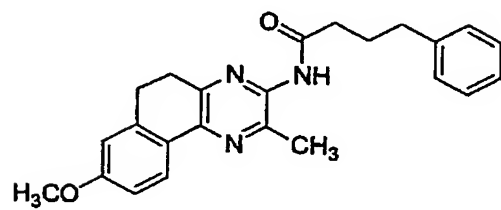
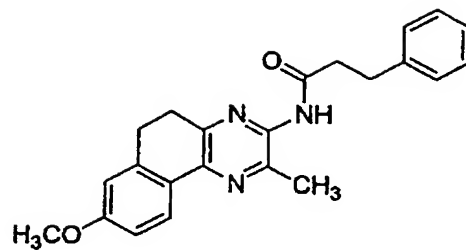
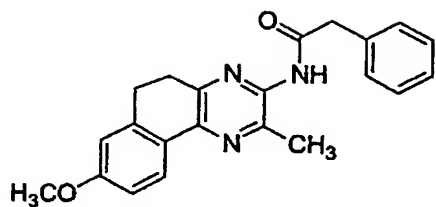
【0404】

【化 305】



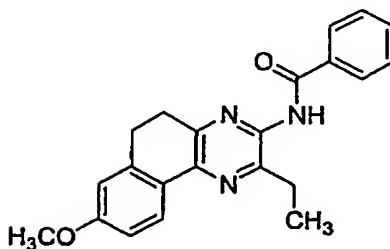
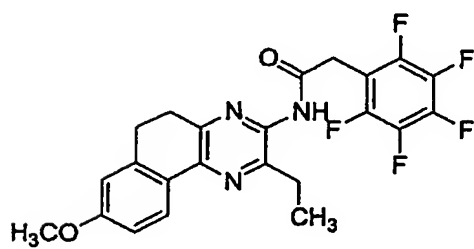
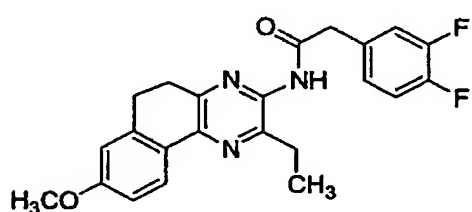
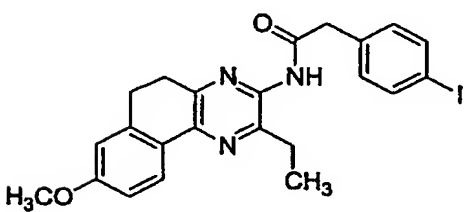
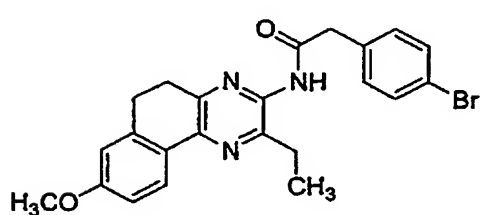
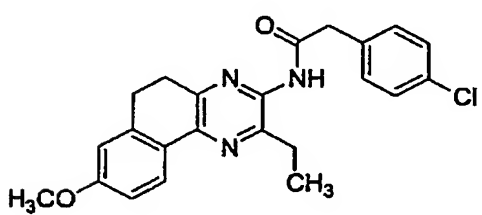
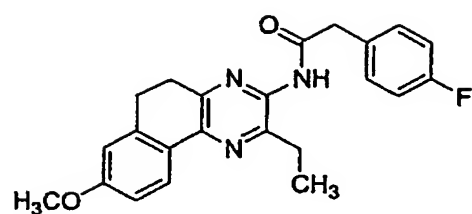
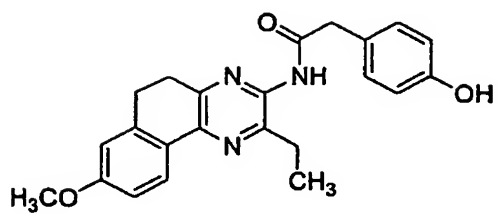
【0405】

【化 306】



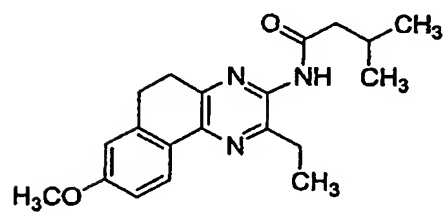
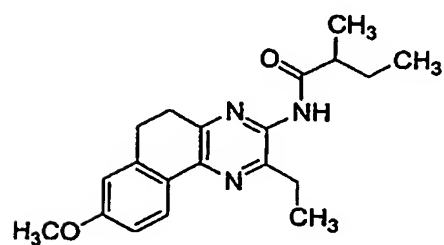
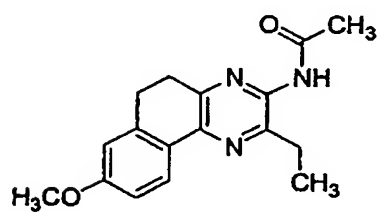
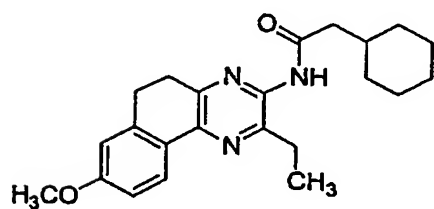
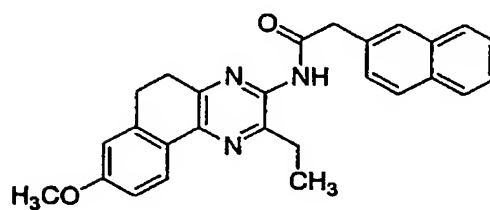
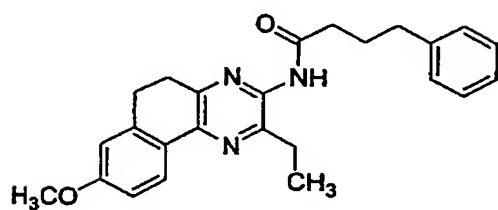
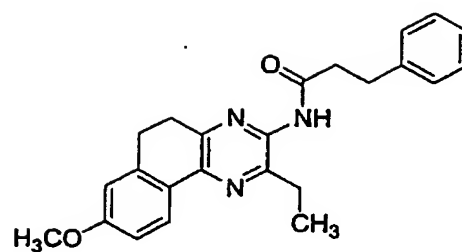
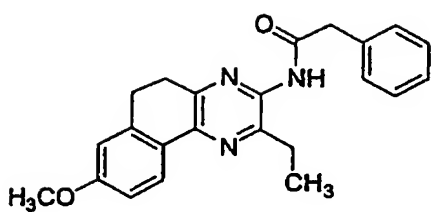
【0406】

【化 307】



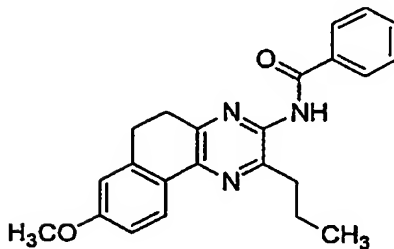
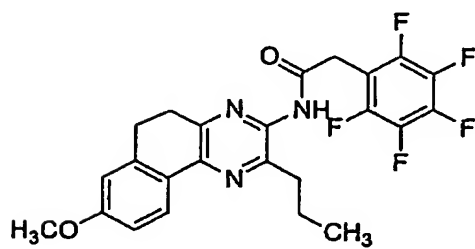
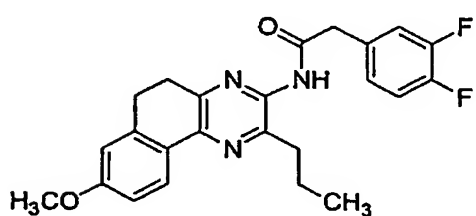
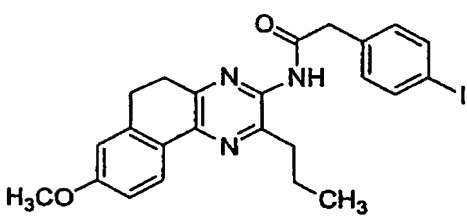
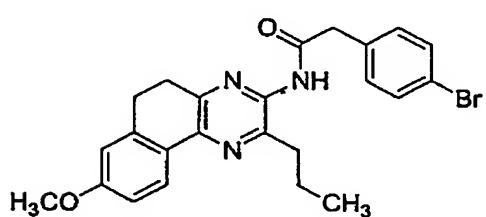
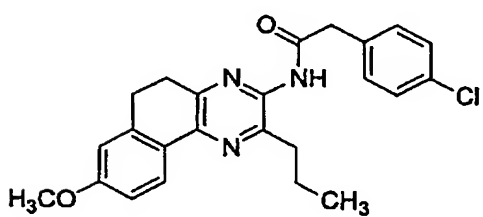
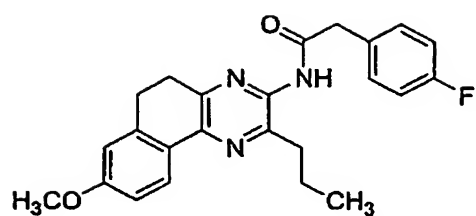
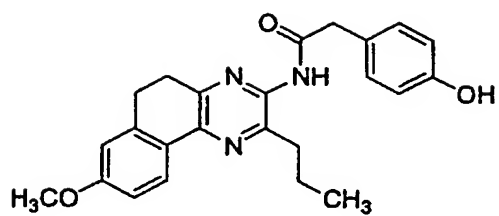
【0407】

【化 308】



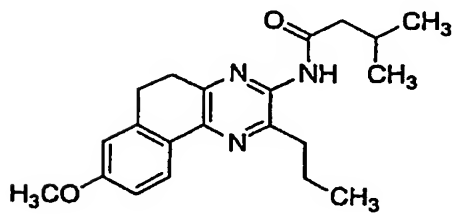
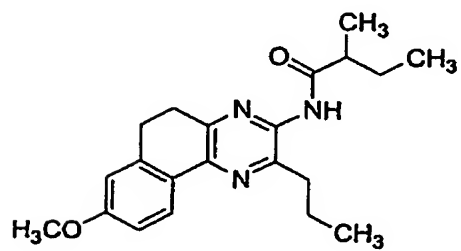
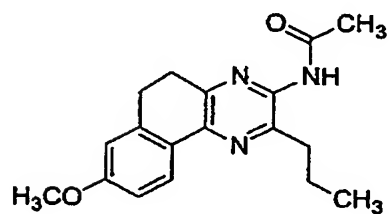
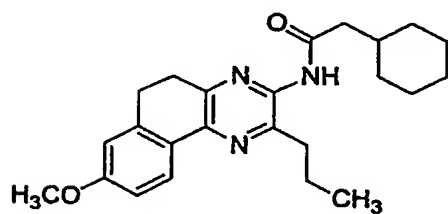
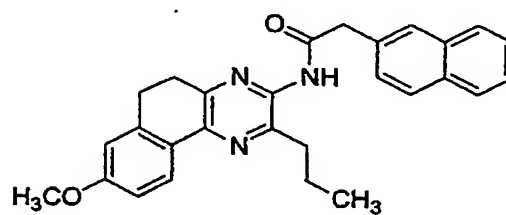
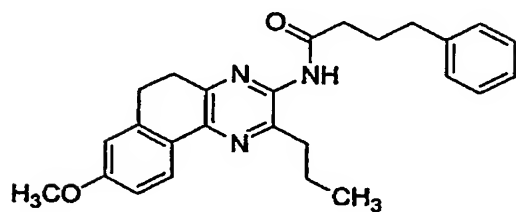
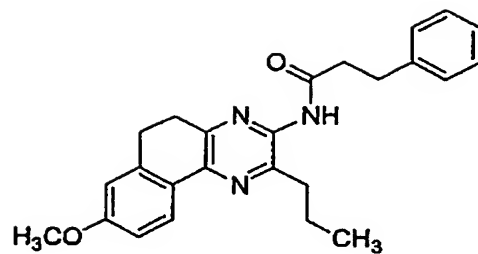
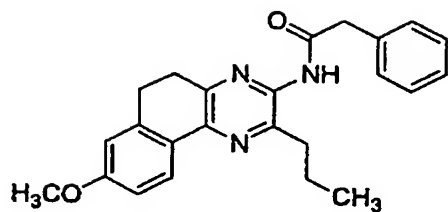
【0408】

【化 309】



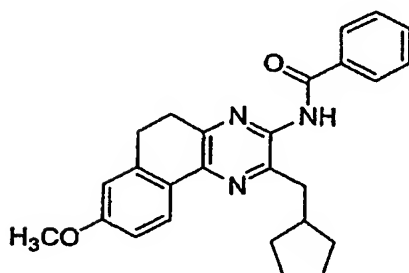
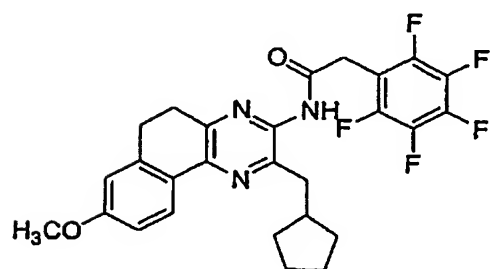
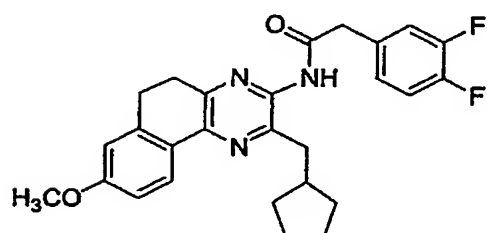
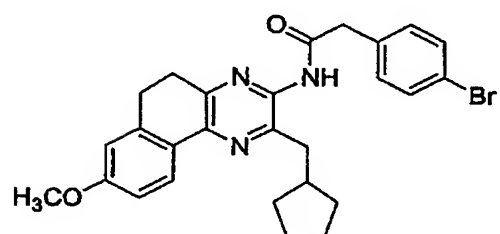
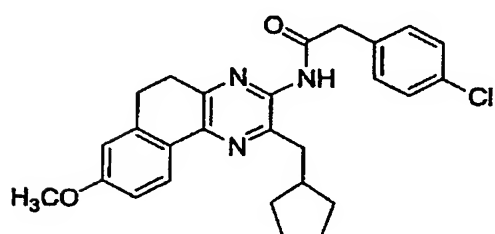
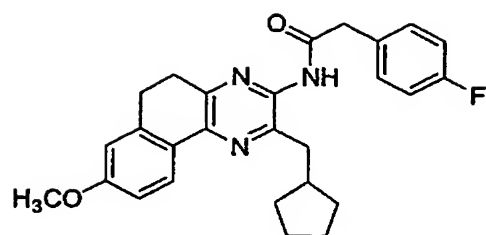
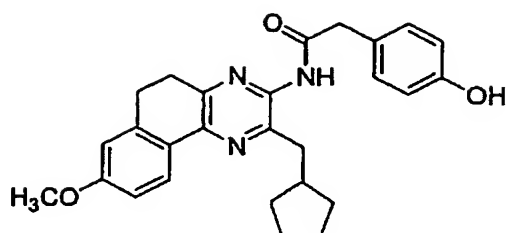
【0409】

【化 3 1 0】



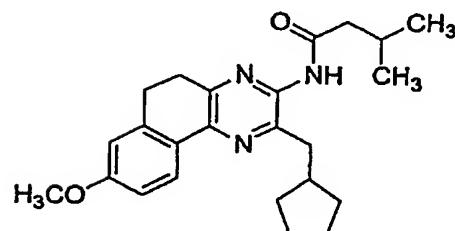
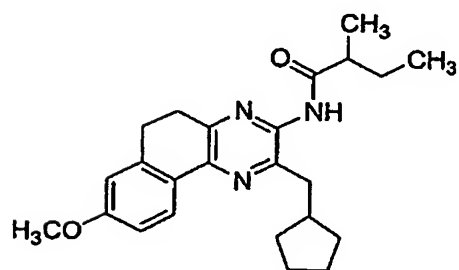
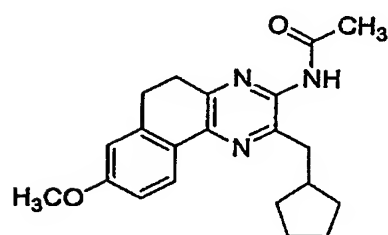
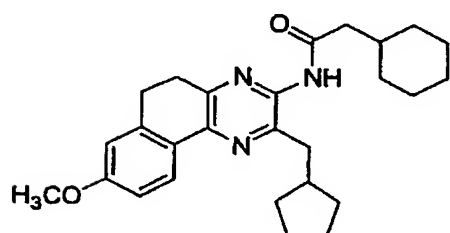
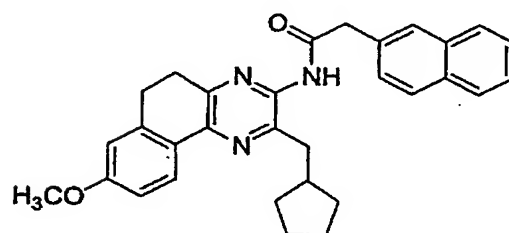
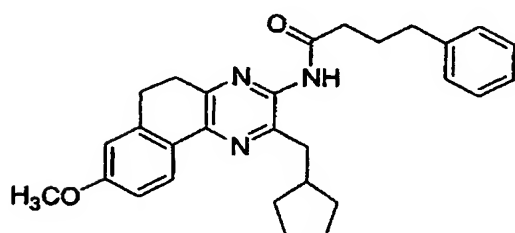
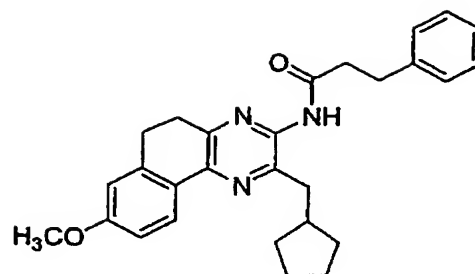
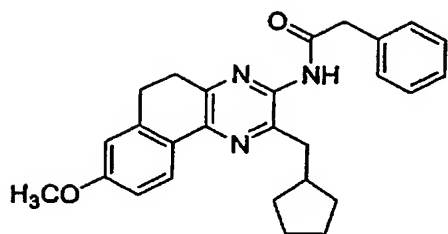
【 0 4 1 0 】

【化 3 1 1】



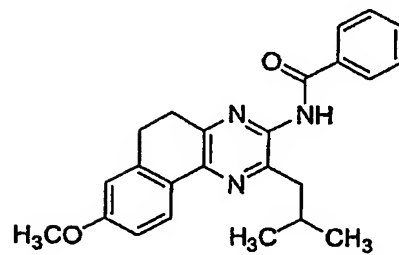
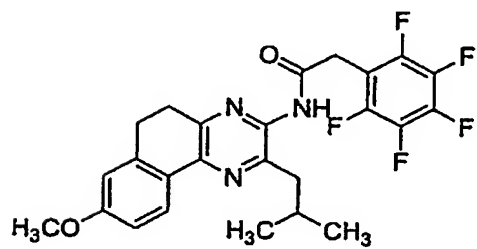
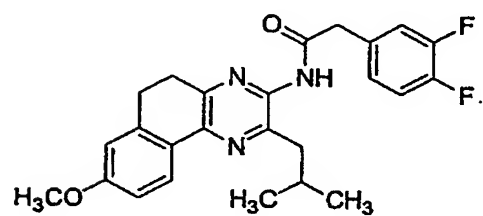
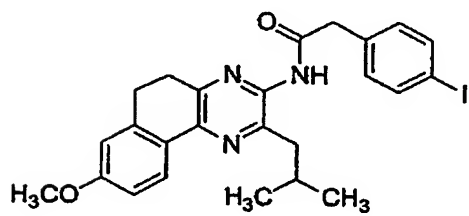
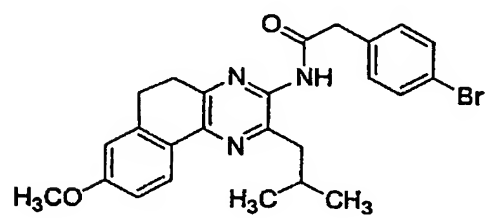
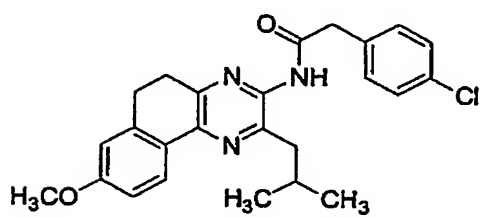
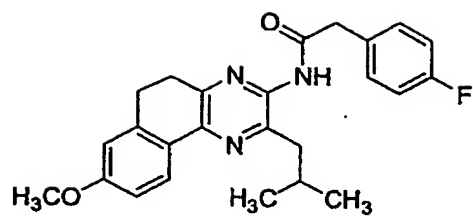
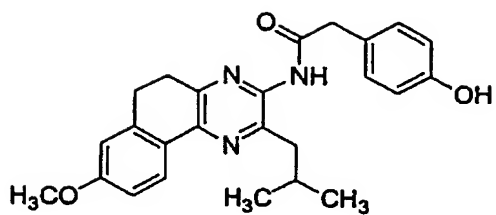
【0 4 1 1】

【化 3 1 2】



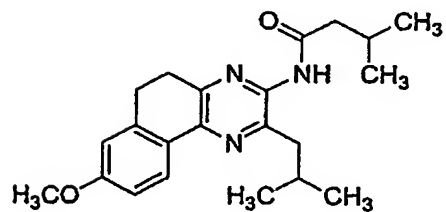
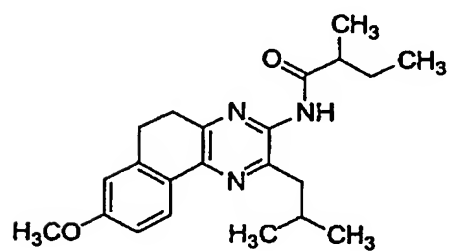
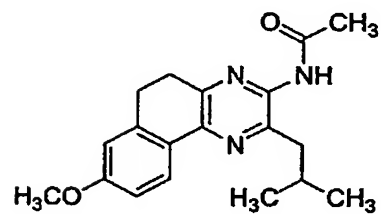
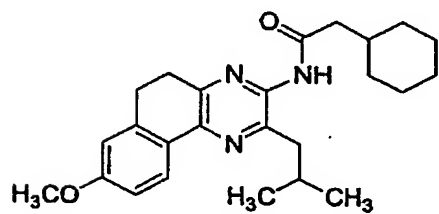
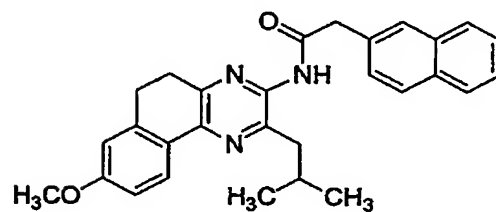
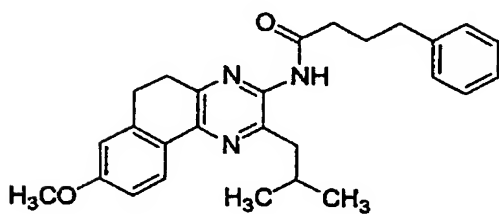
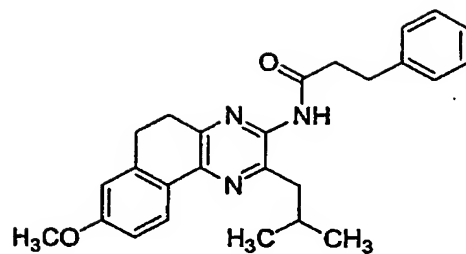
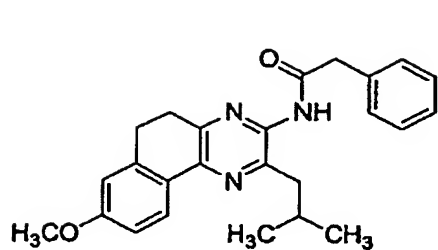
【 0 4 1 2 】

【化 3 1 3】



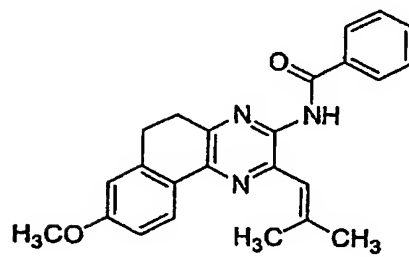
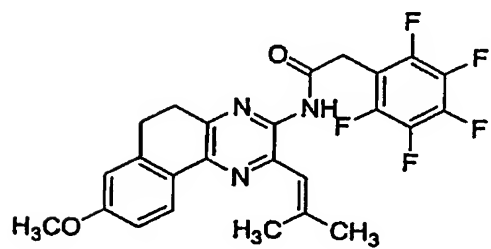
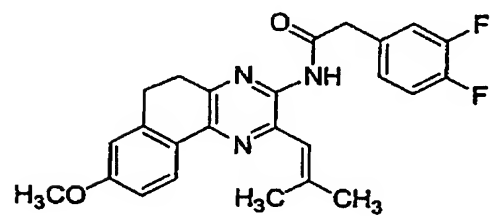
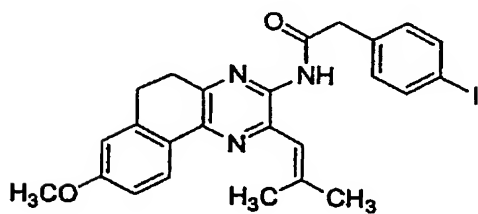
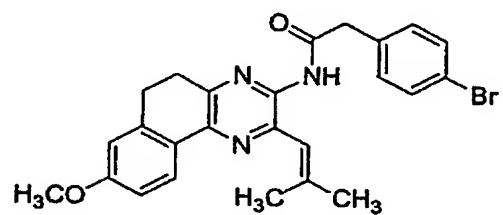
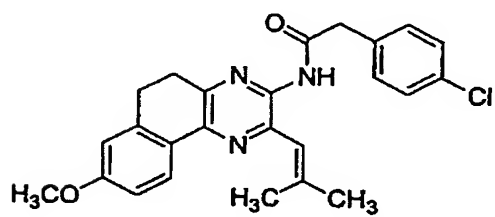
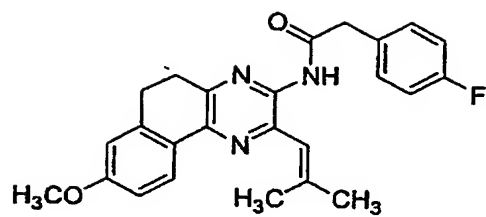
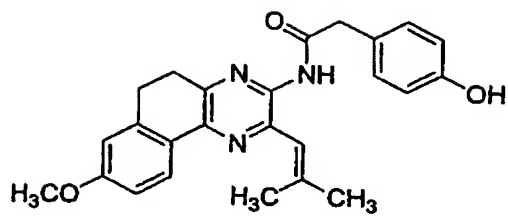
【 0 4 1 3 】

【化 3 1 4】



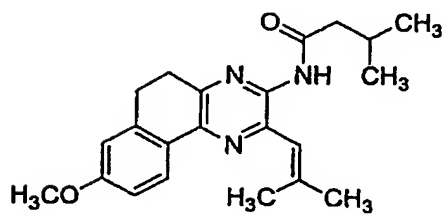
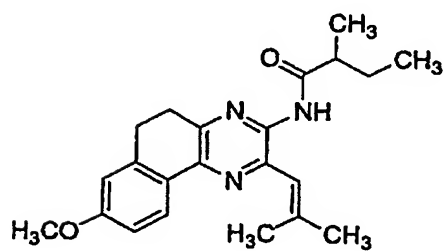
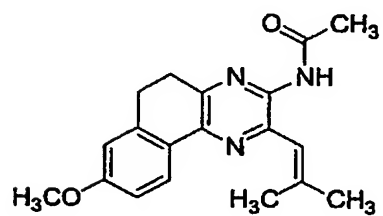
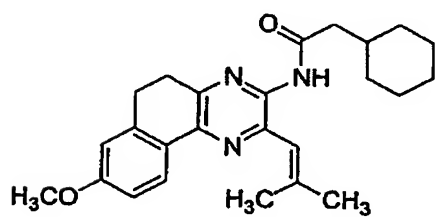
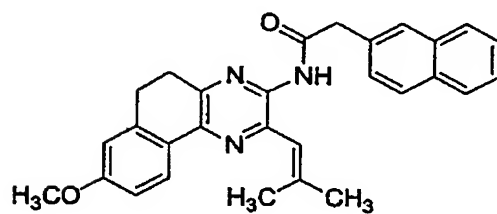
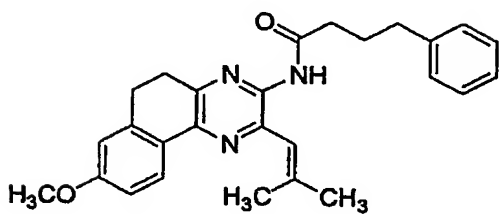
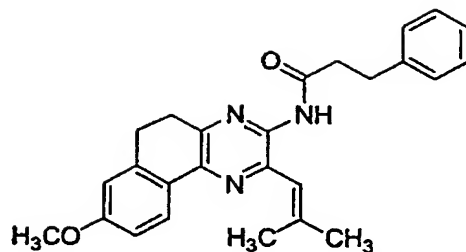
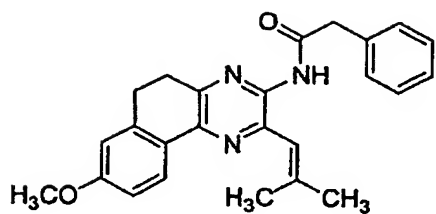
【 0 4 1 4 】

【化 3 1 5】



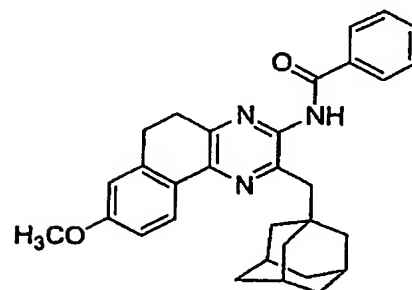
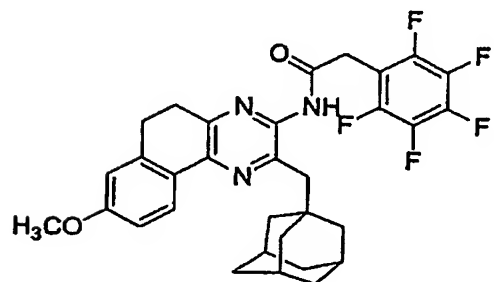
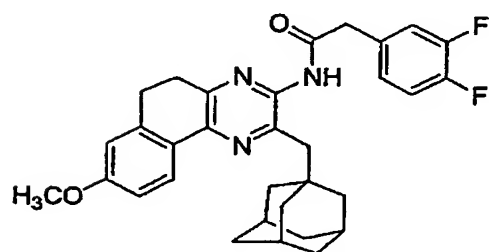
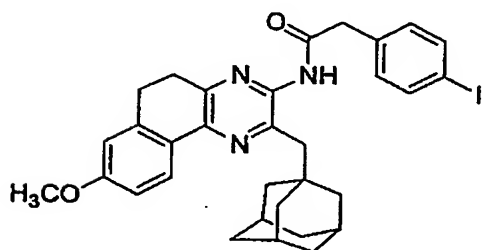
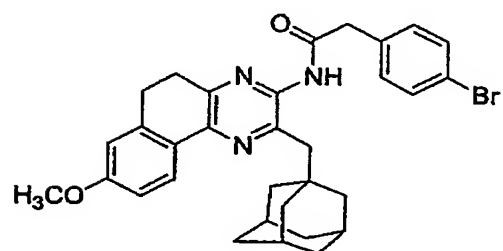
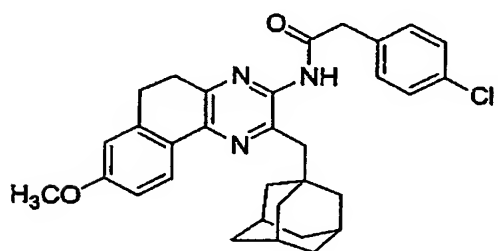
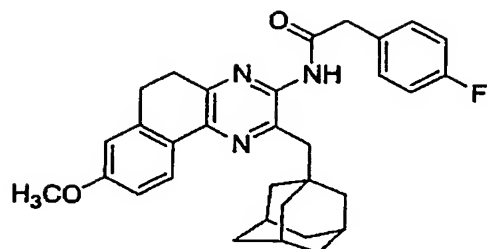
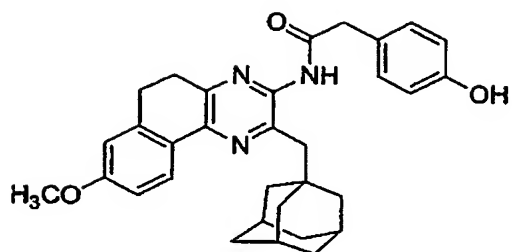
【 0 4 1 5 】

【化 3 1 6】



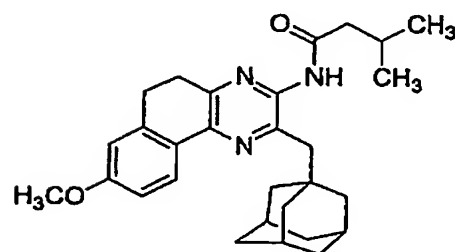
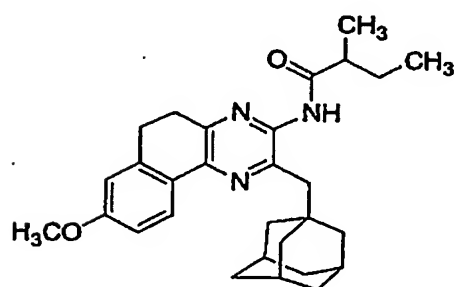
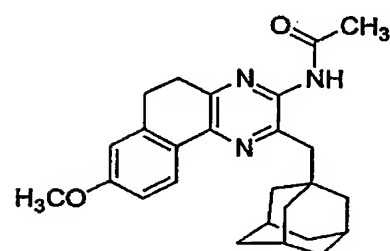
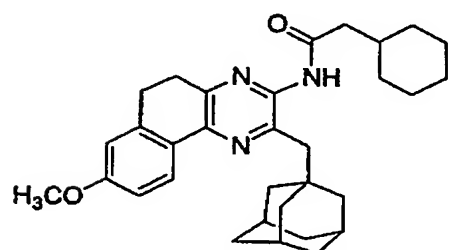
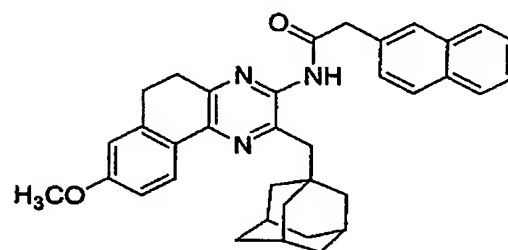
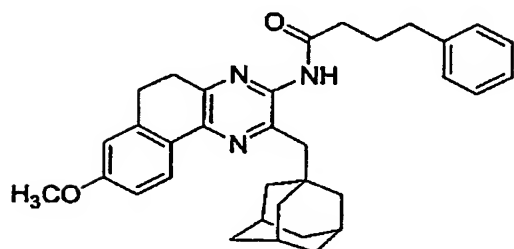
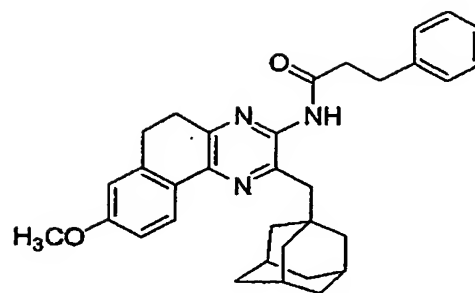
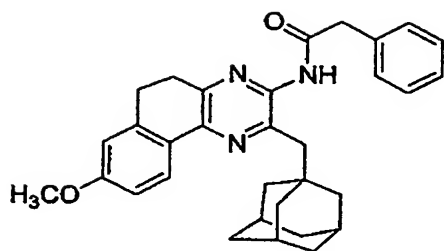
【 0 4 1 6 】

【化 3 1 7】



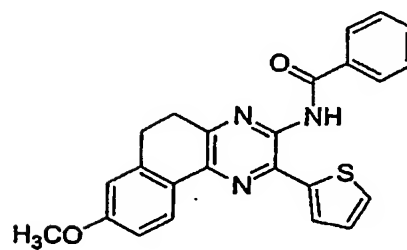
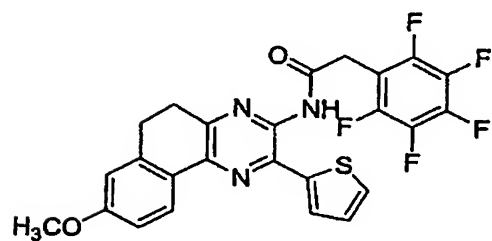
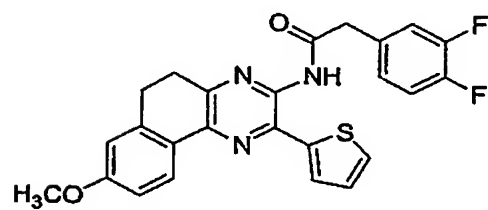
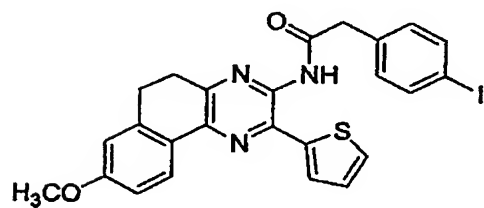
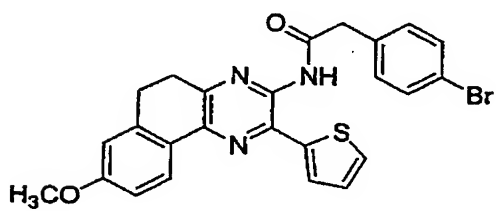
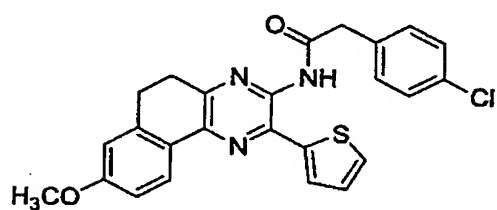
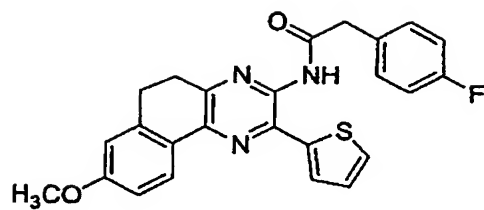
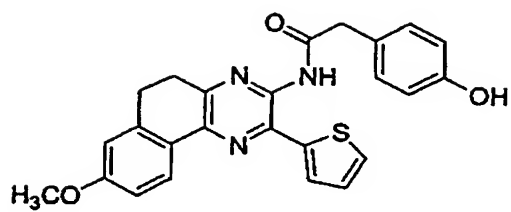
【 0 4 1 7 】

【化 3 1 8】



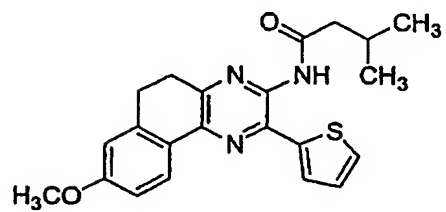
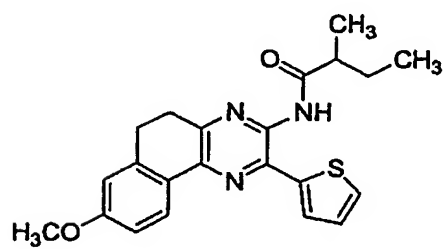
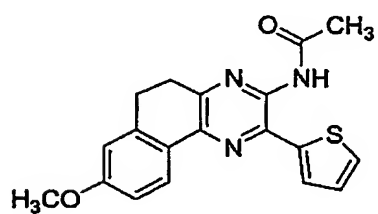
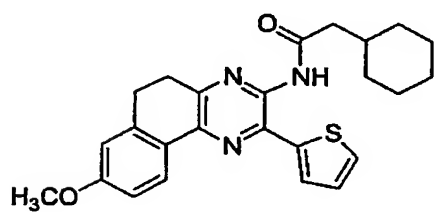
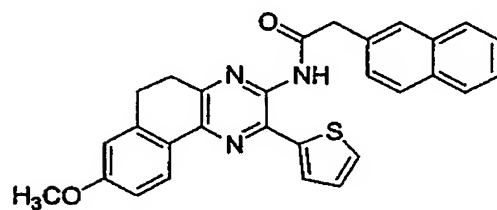
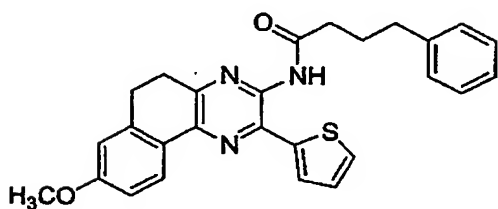
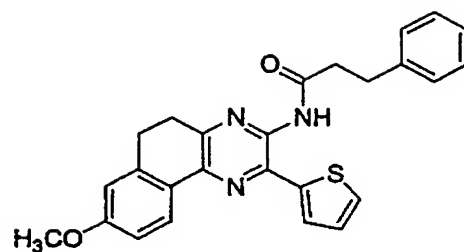
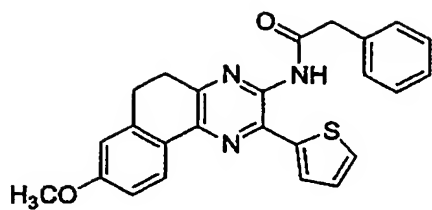
【0 4 1 8】

【化 3 1 9】



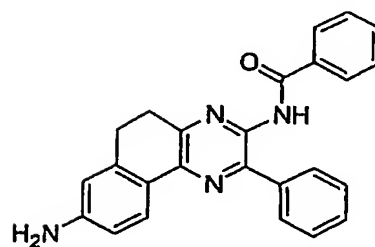
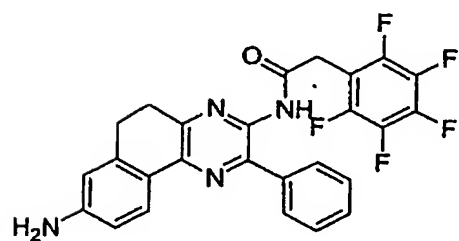
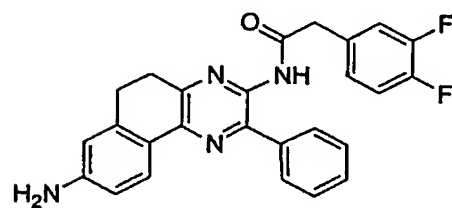
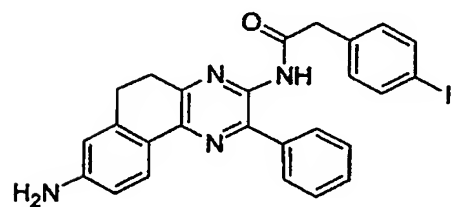
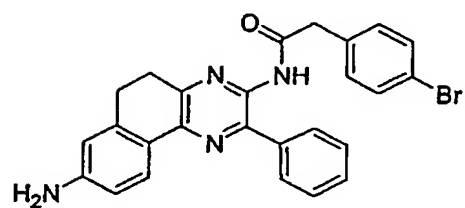
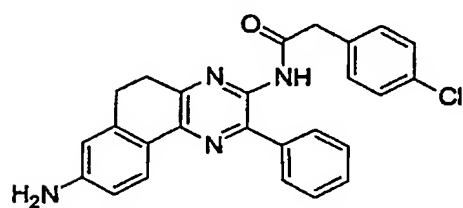
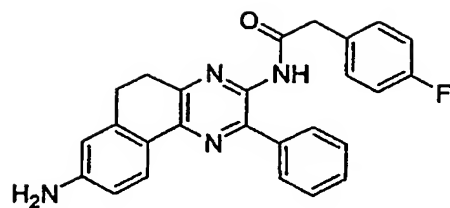
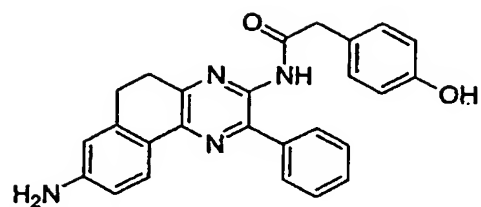
【 0 4 1 9】

【化 3 2 0】



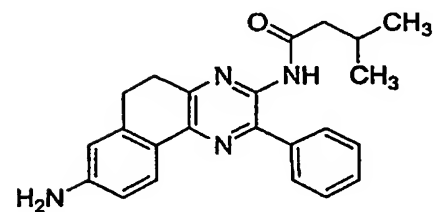
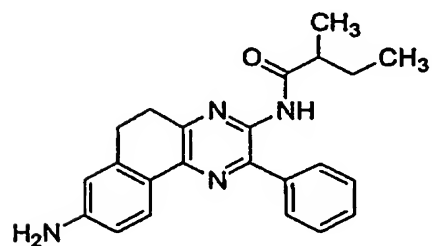
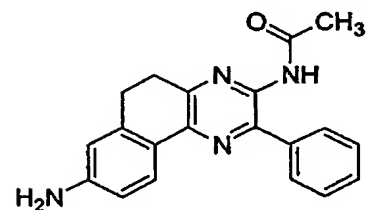
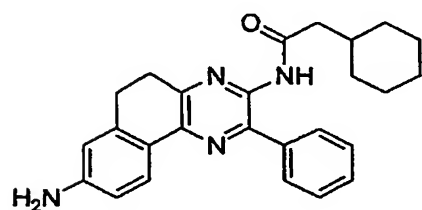
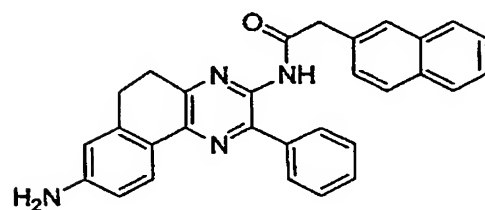
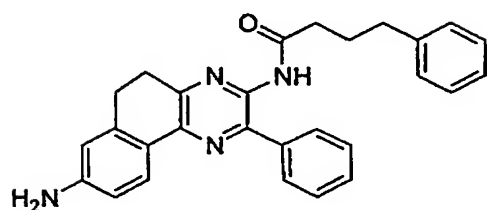
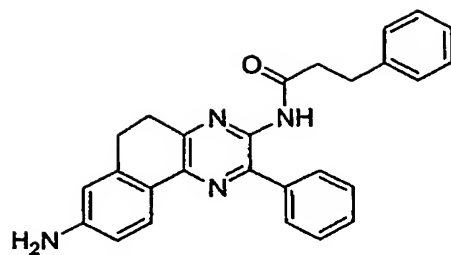
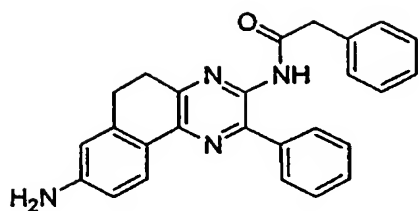
【 0 4 2 0】

【化 3 2 1】



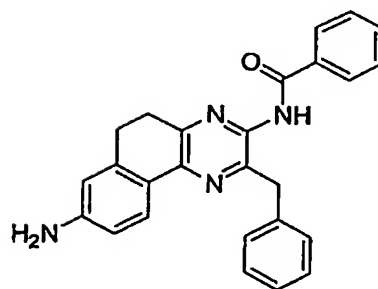
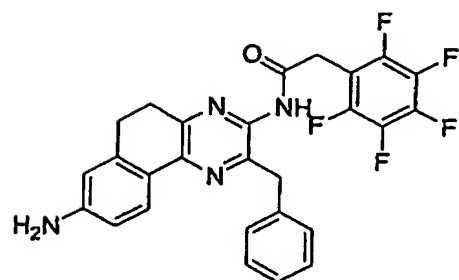
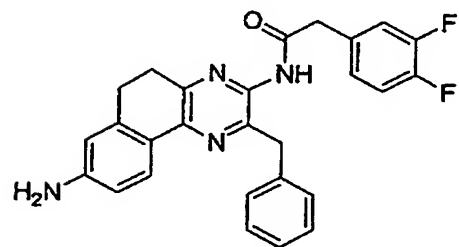
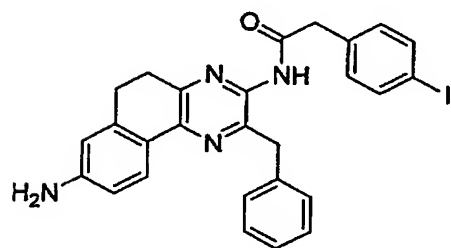
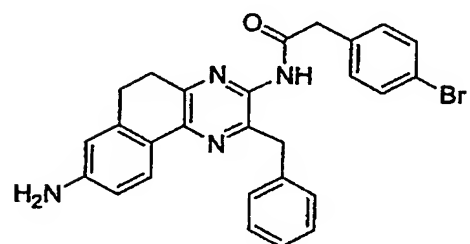
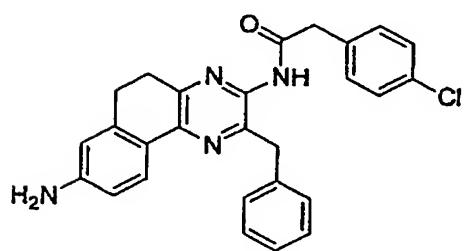
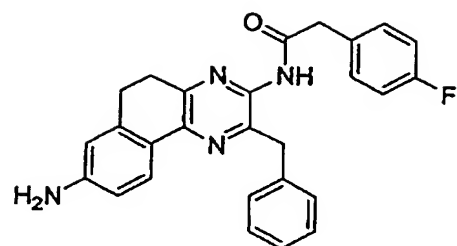
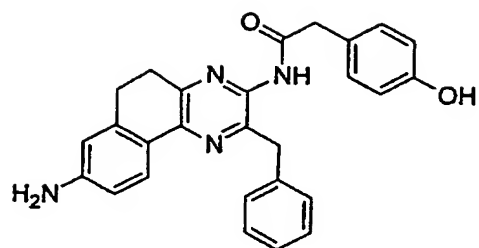
【 0 4 2 1】

【化 3 2 2】



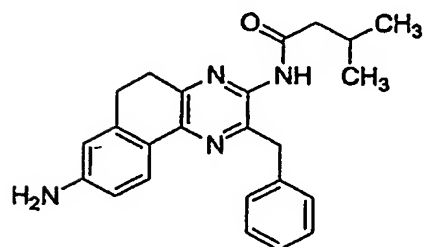
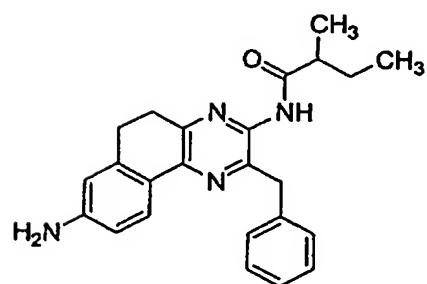
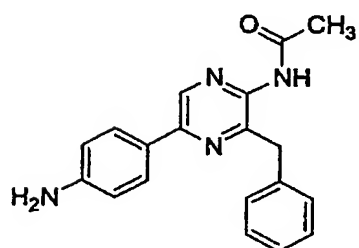
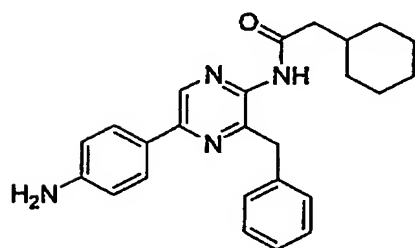
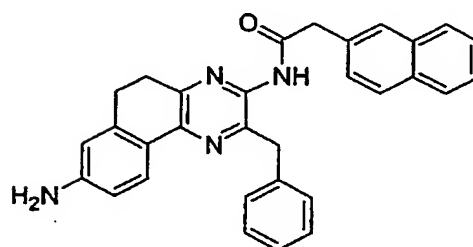
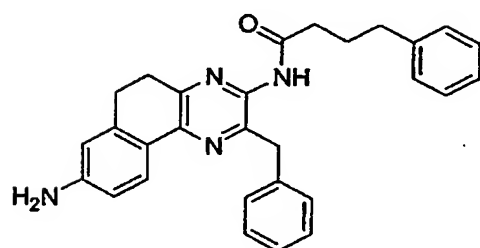
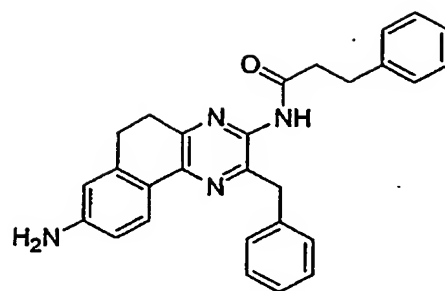
【 0 4 2 2】

【化 3 2 3】



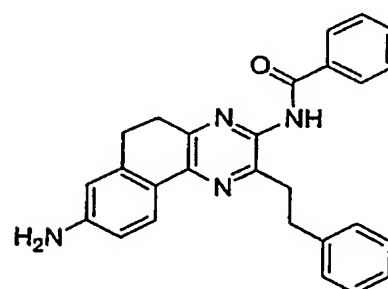
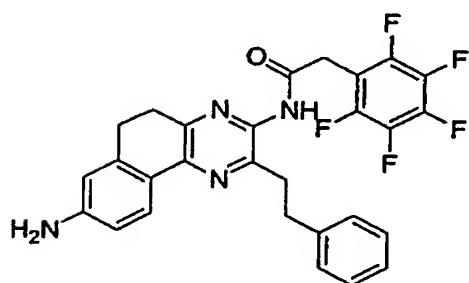
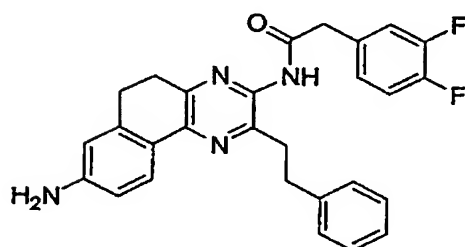
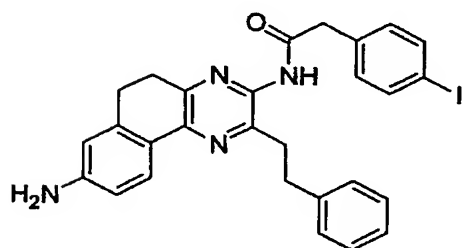
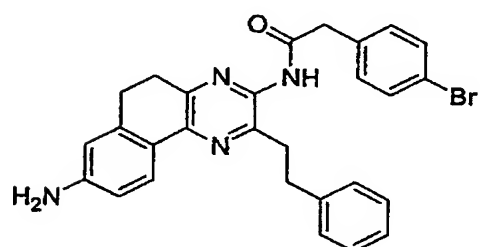
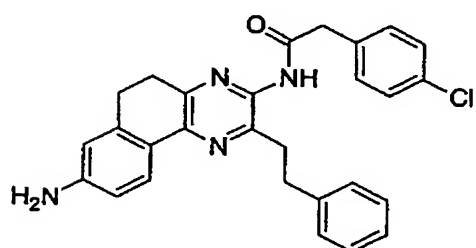
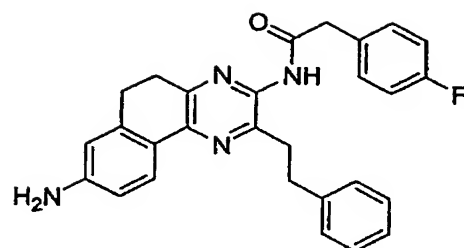
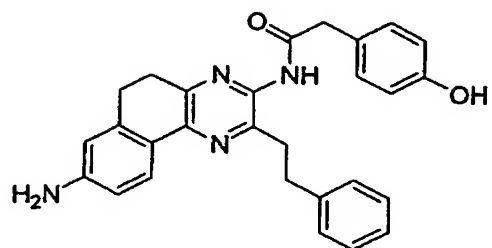
【0 4 2 3】

【化 3 2 4】



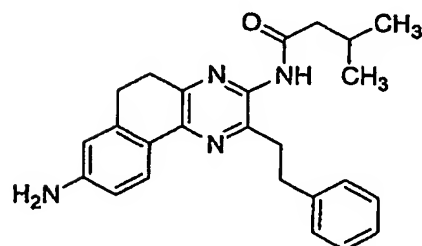
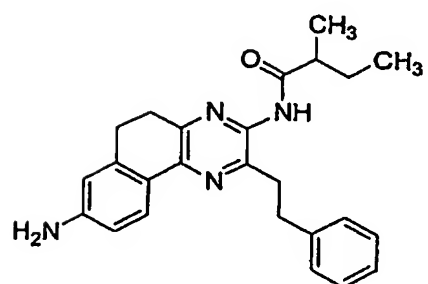
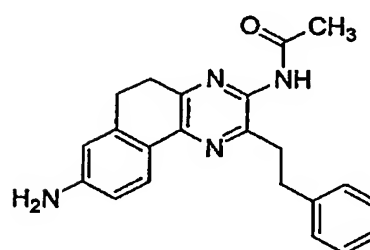
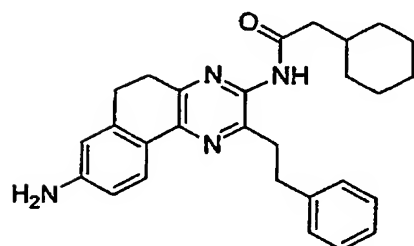
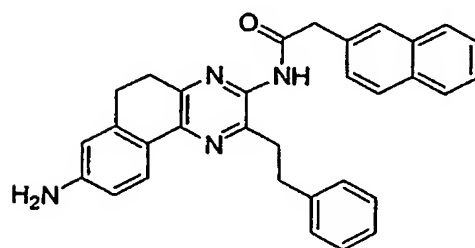
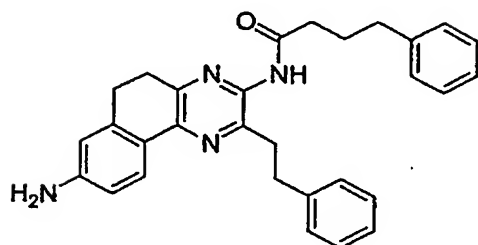
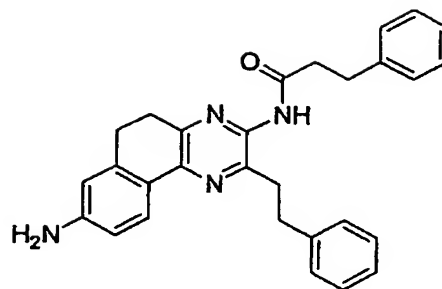
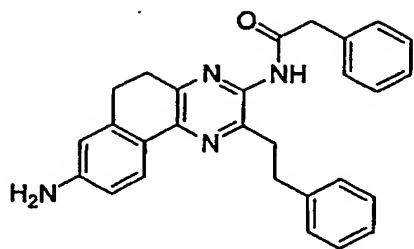
【 0 4 2 4】

【化 3 2 5】



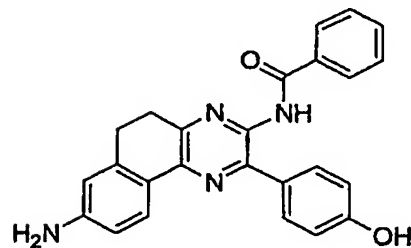
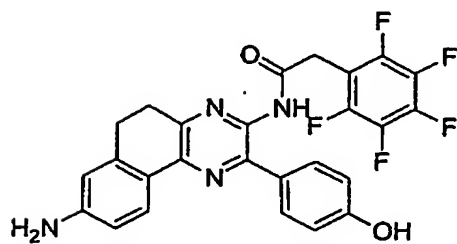
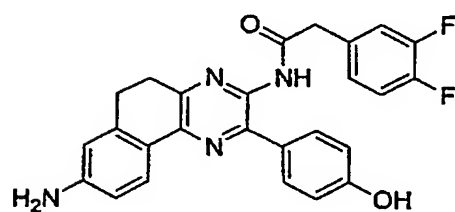
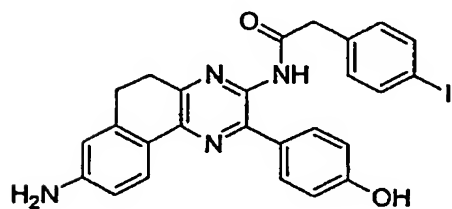
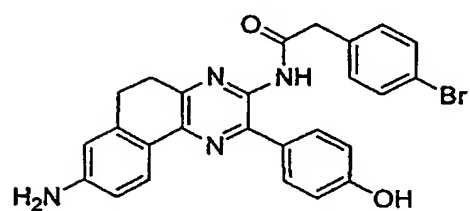
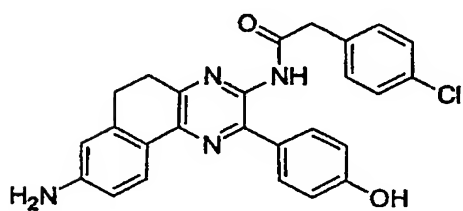
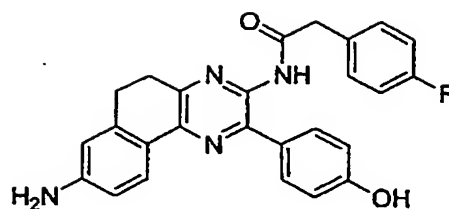
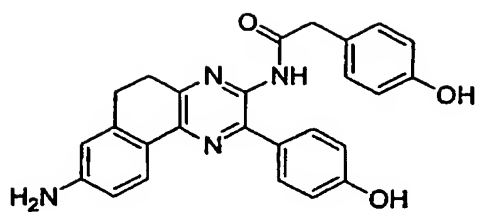
【0 4 2 5】

【化 3 2 6】



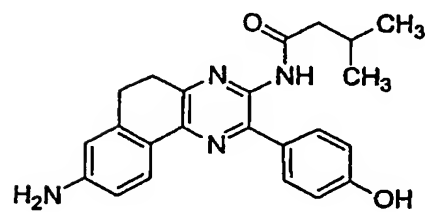
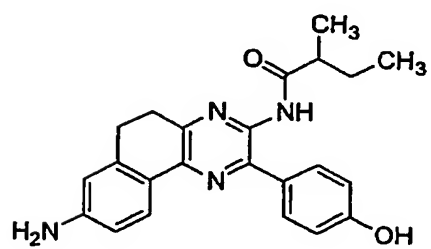
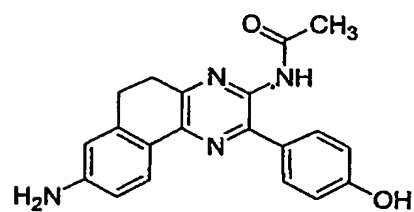
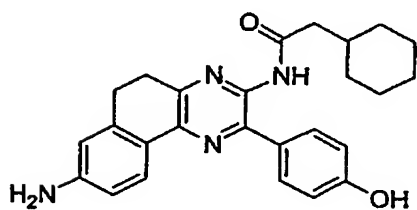
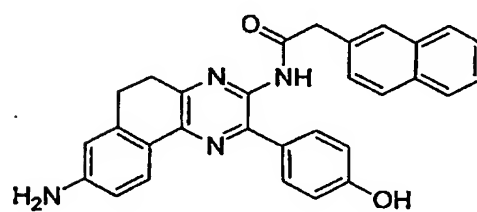
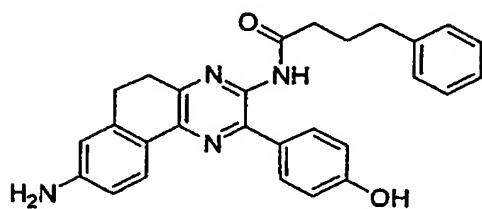
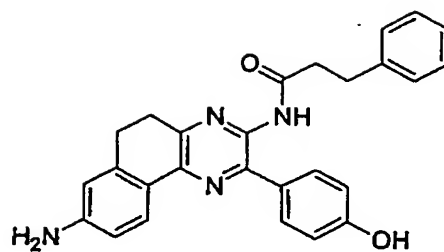
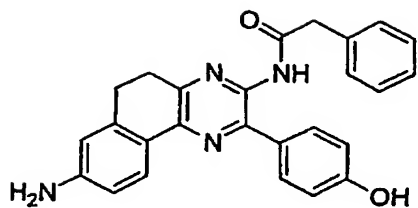
【 0 4 2 6】

【化 3 2 7】



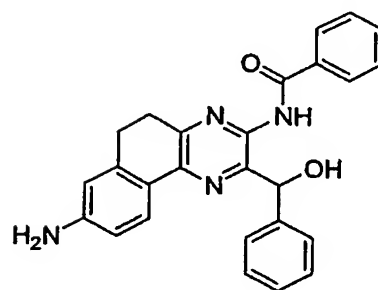
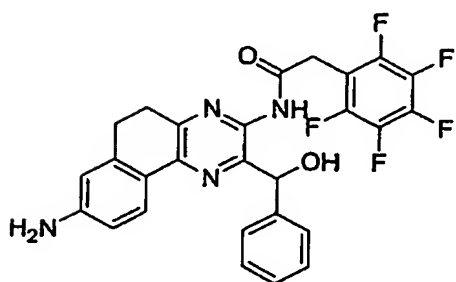
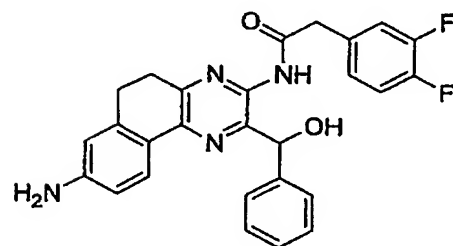
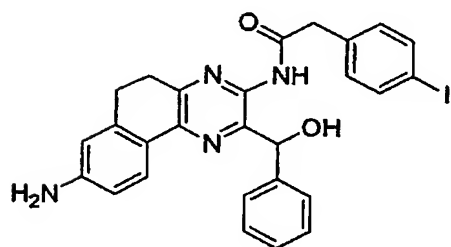
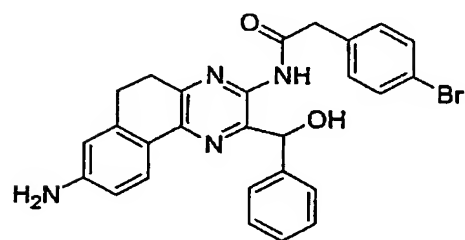
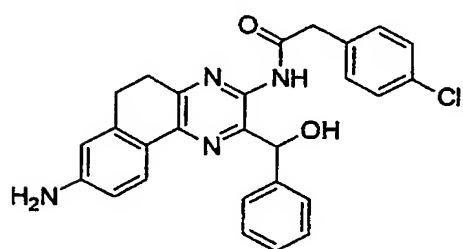
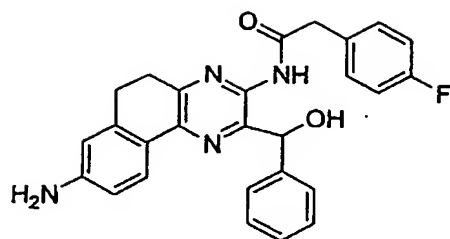
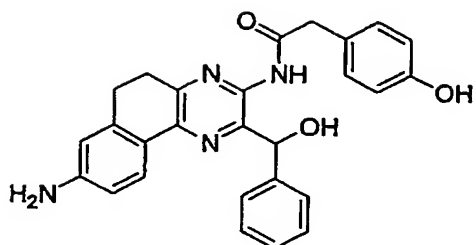
【 0 4 2 7 】

【化 3 2 8】



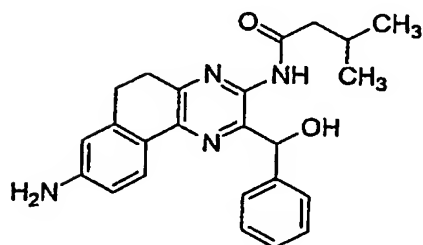
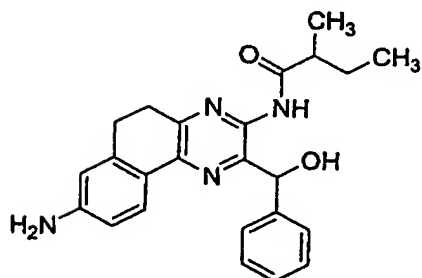
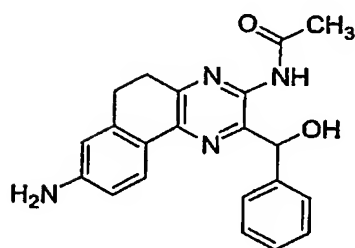
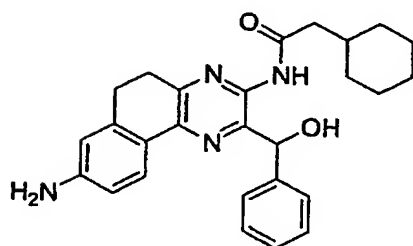
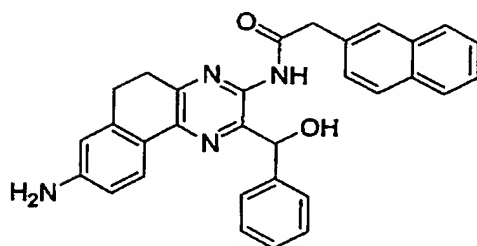
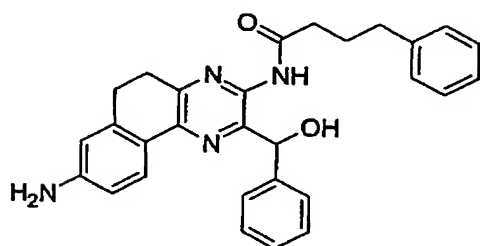
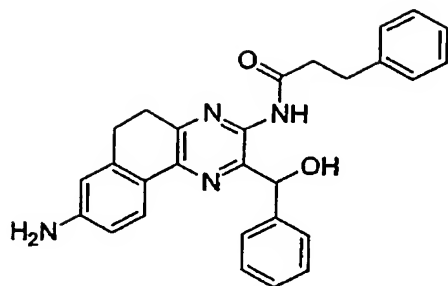
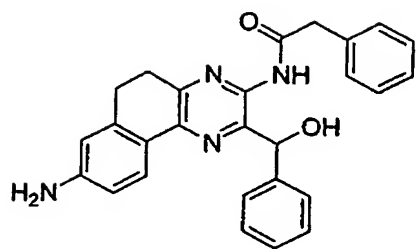
【 0 4 2 8】

【化 3 2 9】



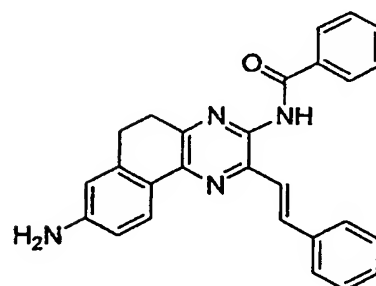
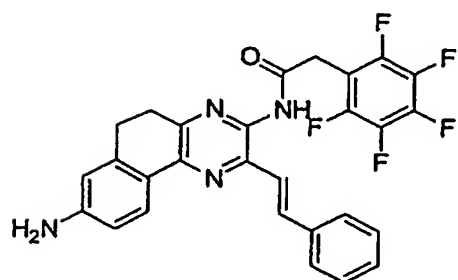
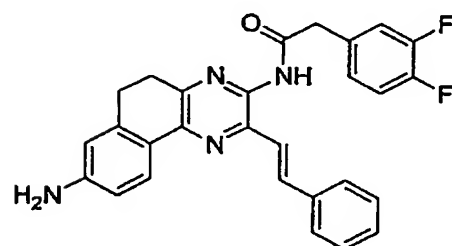
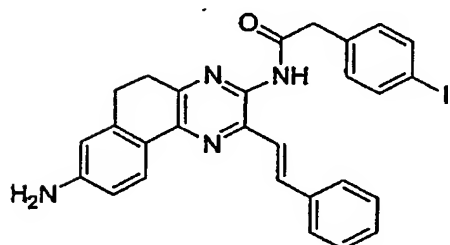
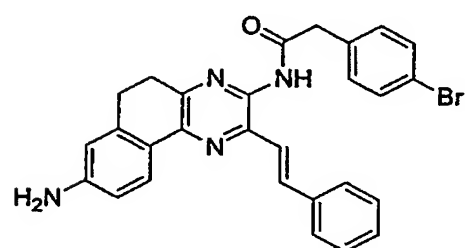
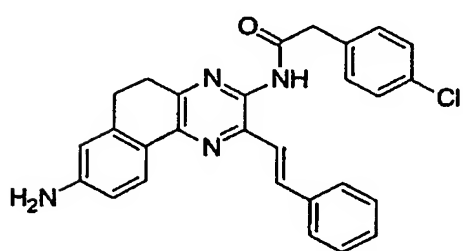
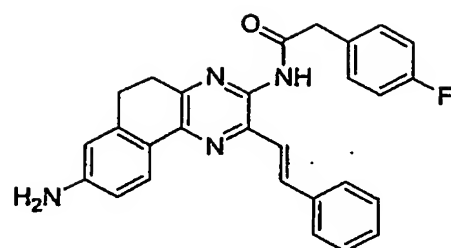
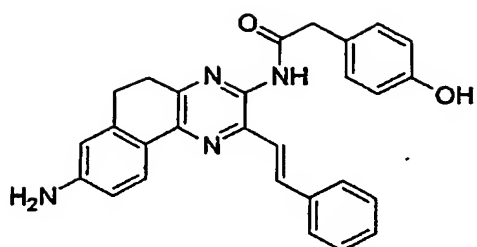
【0 4 2 9】

【化 330】



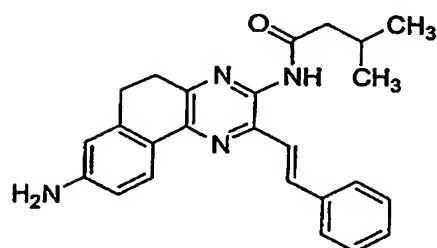
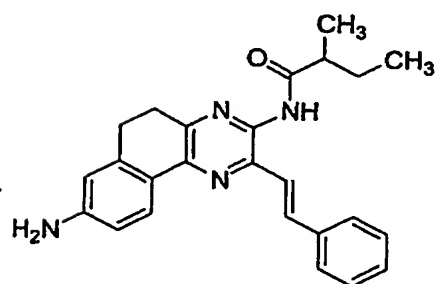
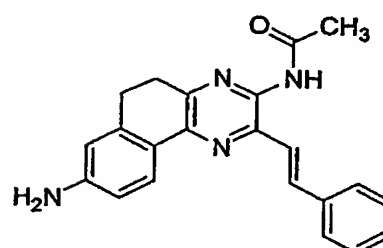
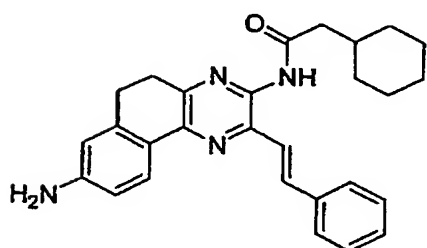
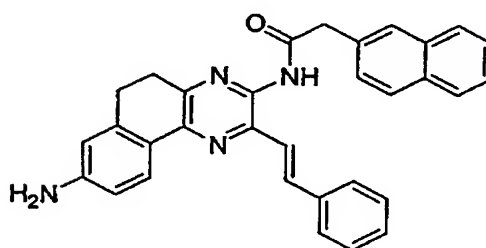
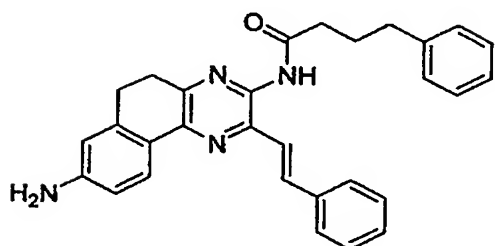
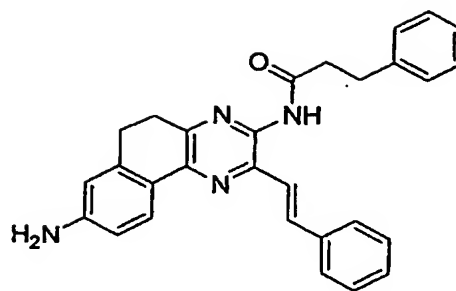
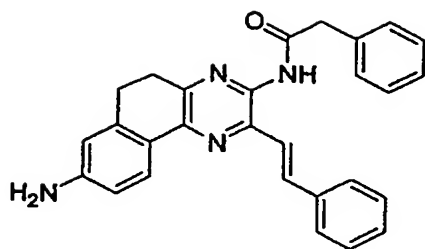
【0430】

【化 3 3 1】



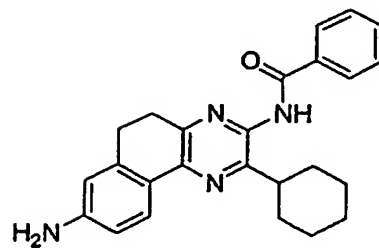
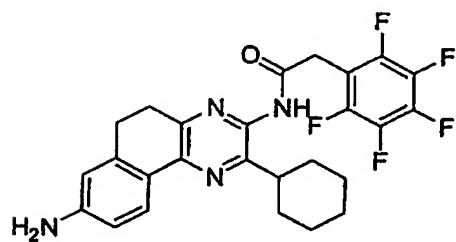
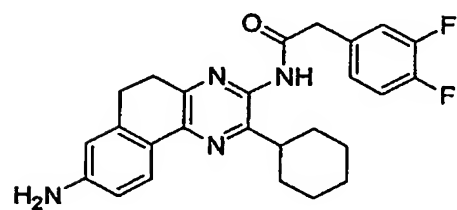
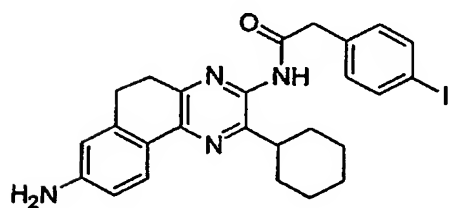
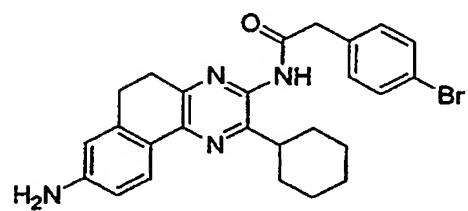
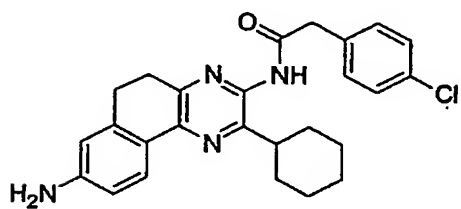
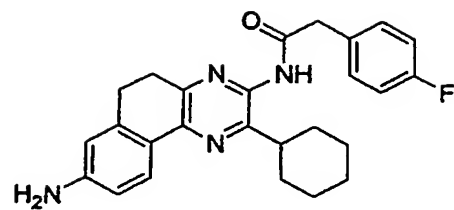
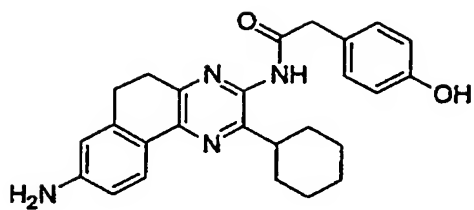
【0 4 3 1】

【化 3 3 2】



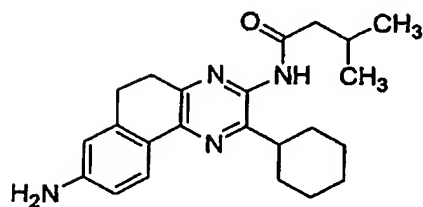
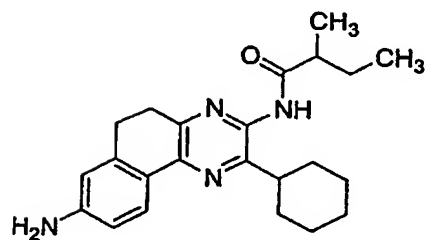
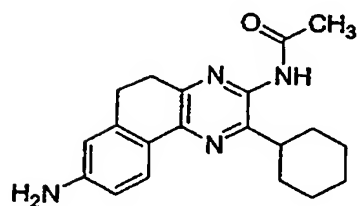
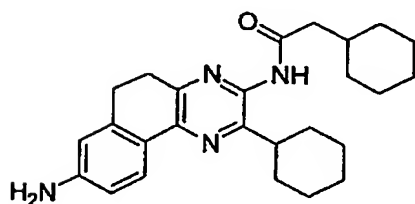
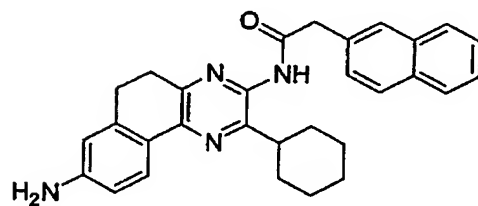
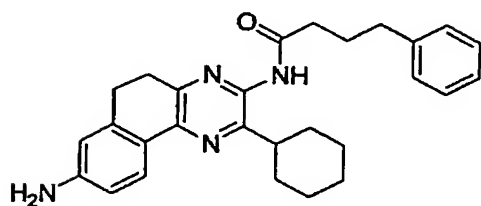
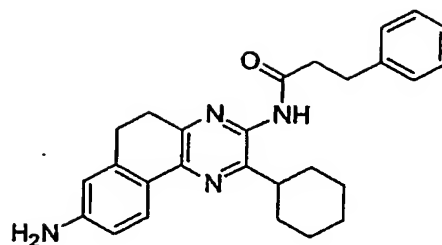
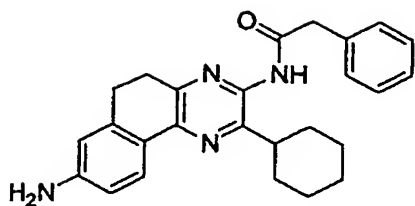
【 0 4 3 2 】

【化 3 3 3】



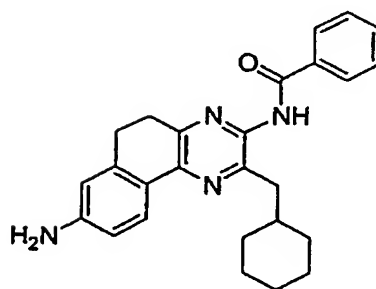
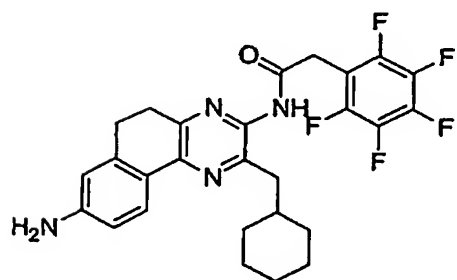
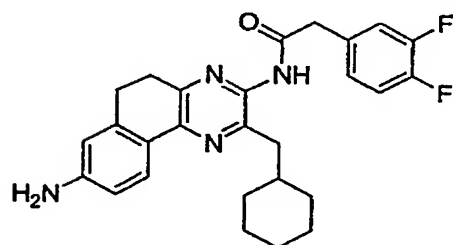
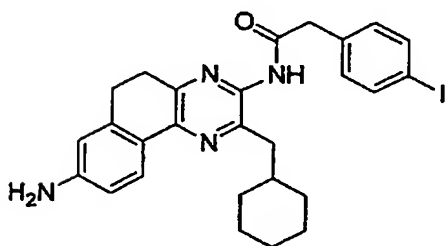
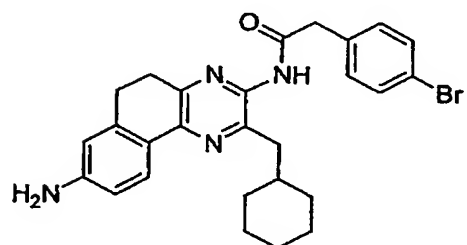
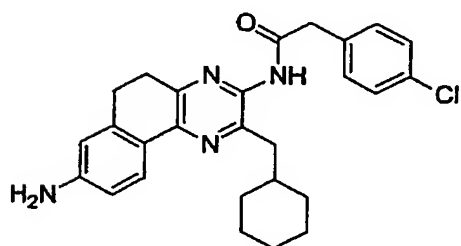
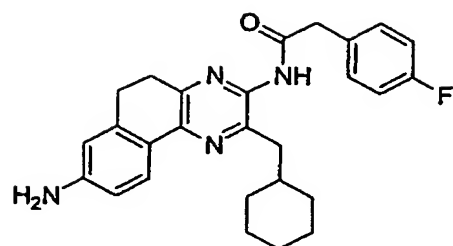
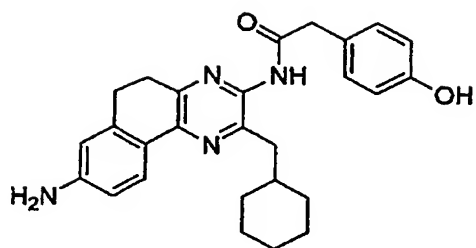
【 0 4 3 3 】

【化 3 3 4】



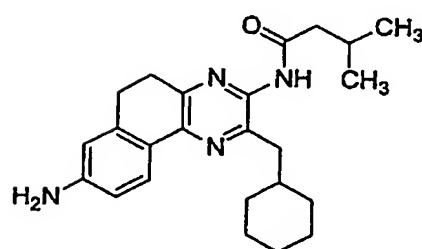
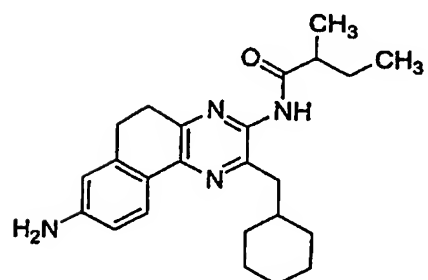
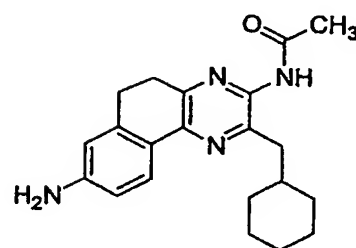
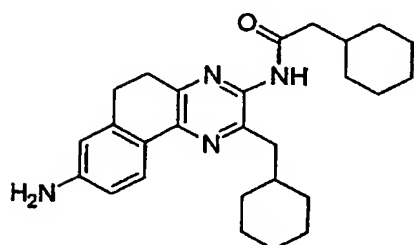
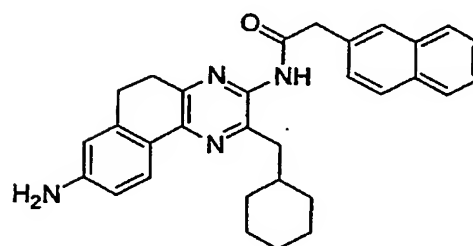
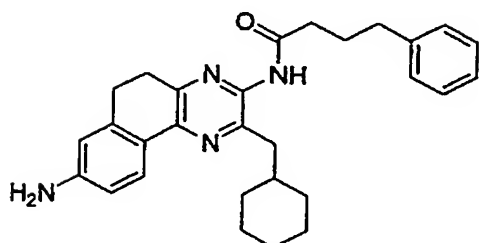
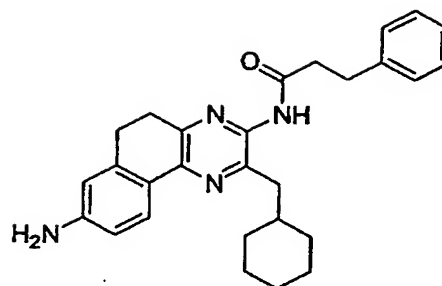
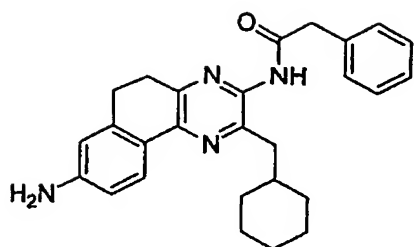
【0 4 3 4】

【化 3 3 5】



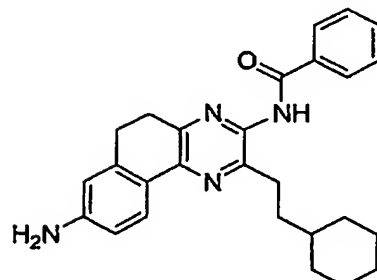
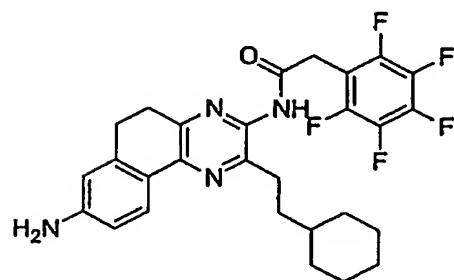
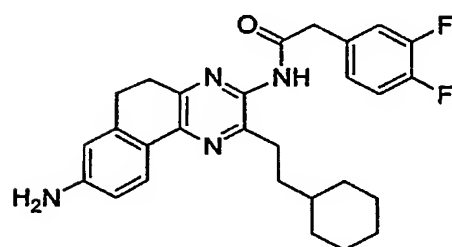
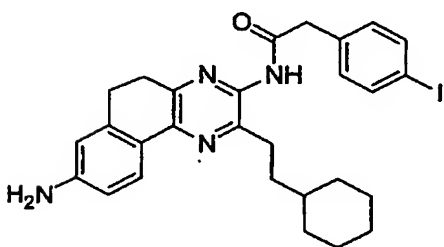
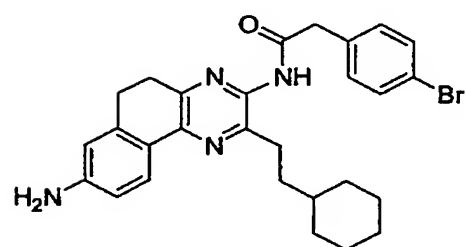
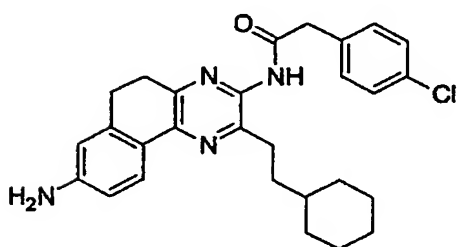
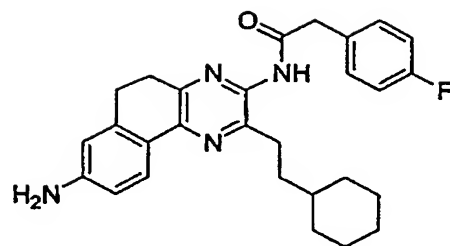
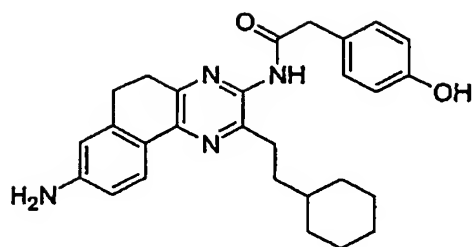
【0 4 3 5】

【化 3 3 6】



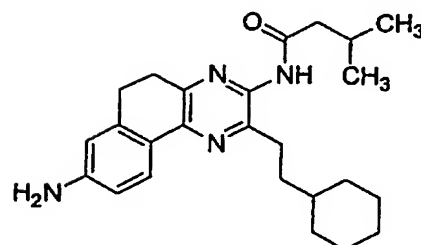
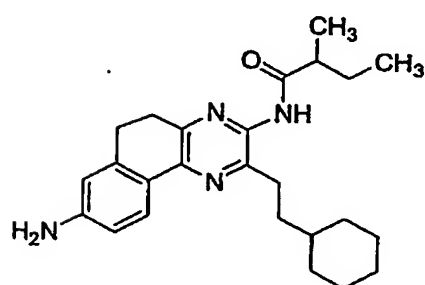
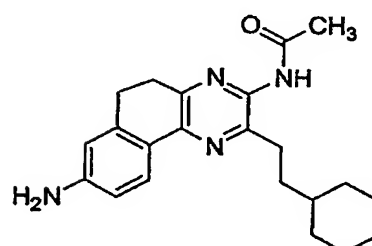
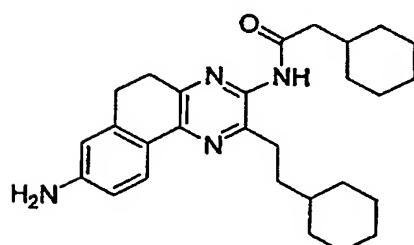
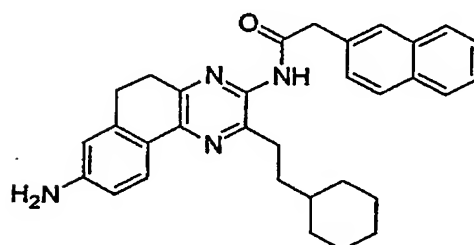
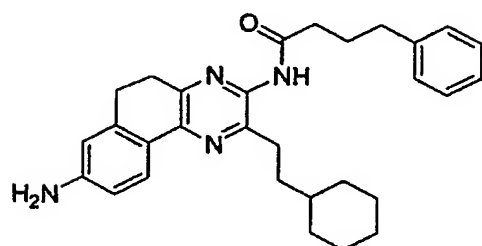
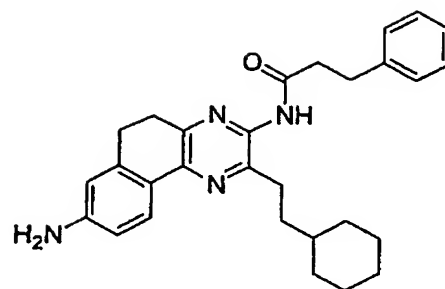
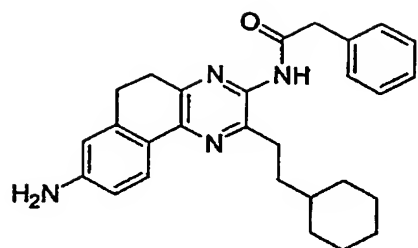
【0 4 3 6】

【化 3 3 7】



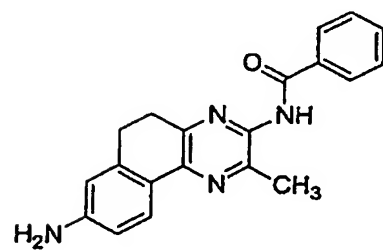
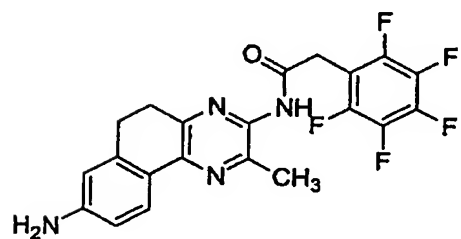
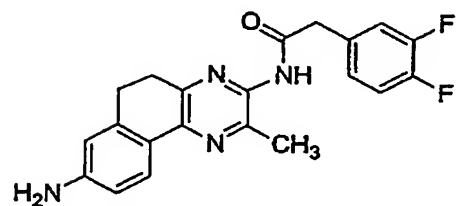
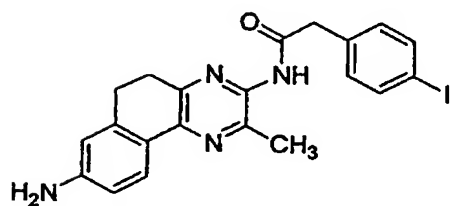
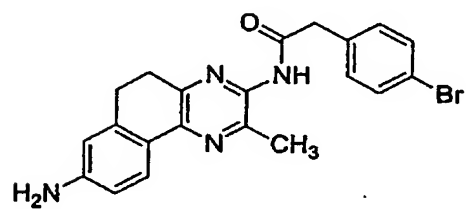
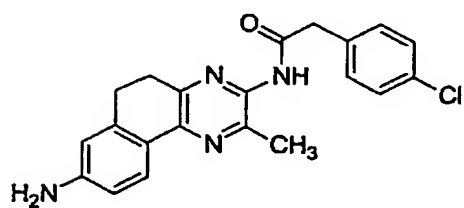
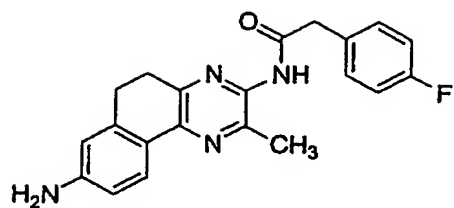
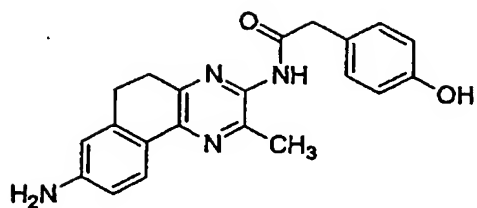
【 0 4 3 7 】

【化 338】



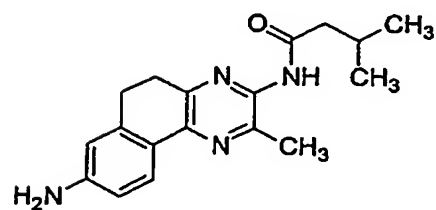
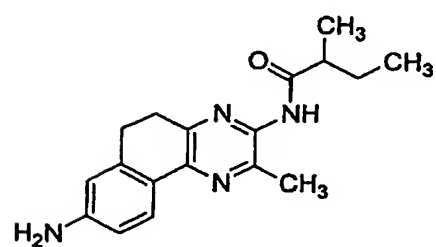
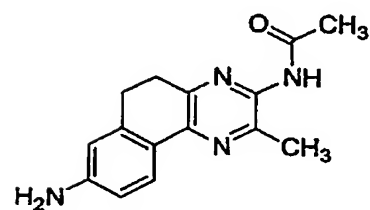
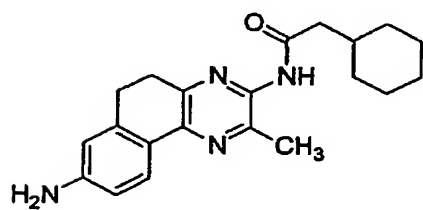
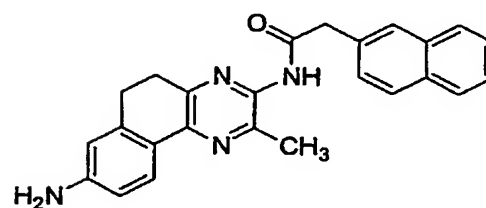
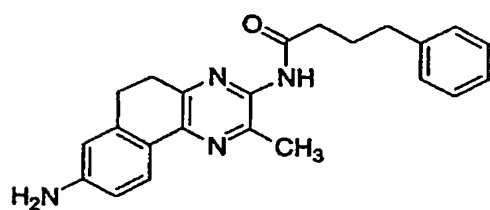
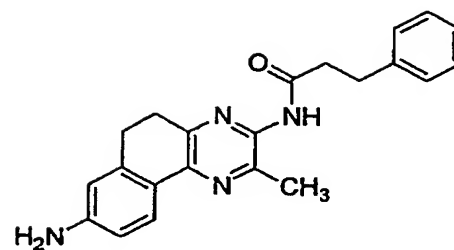
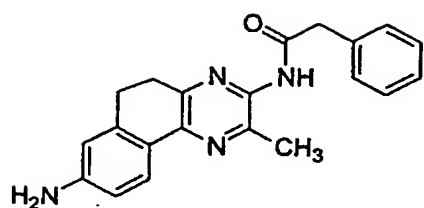
【0438】

【化 3 3 9】



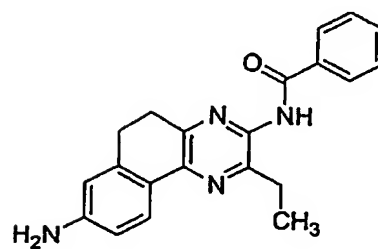
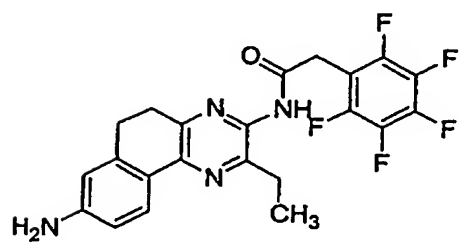
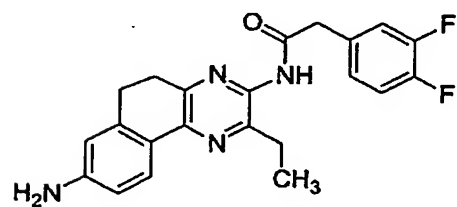
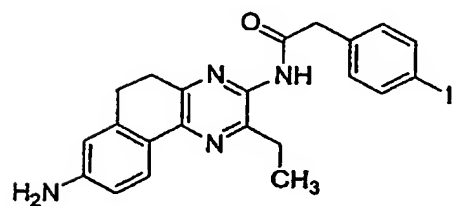
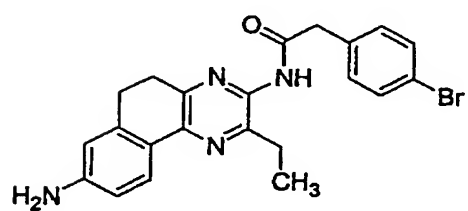
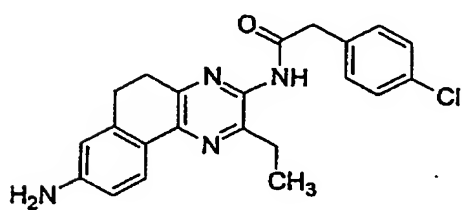
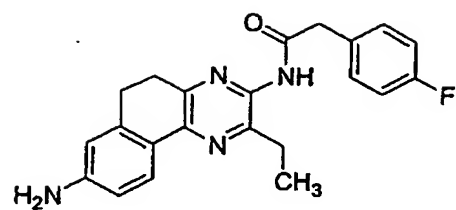
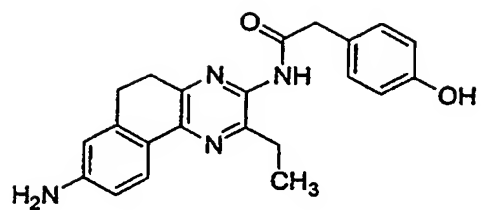
【0 4 3 9】

【化 3 4 0】



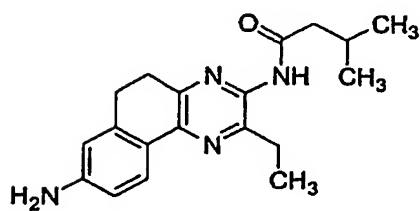
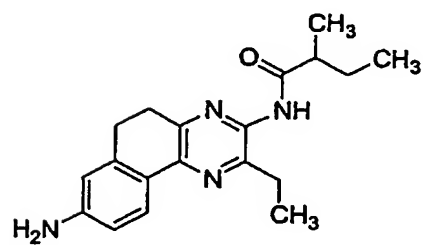
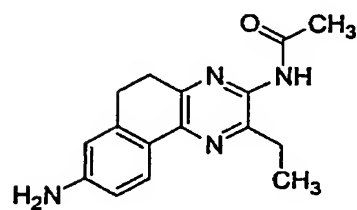
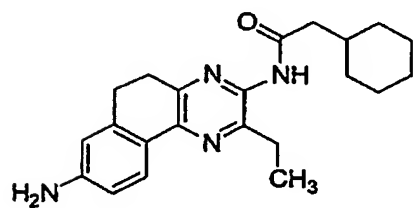
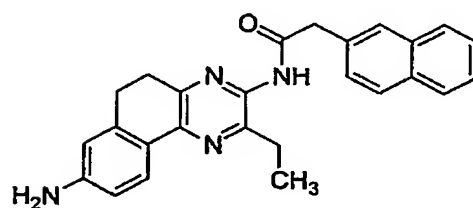
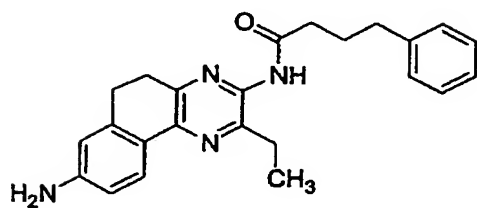
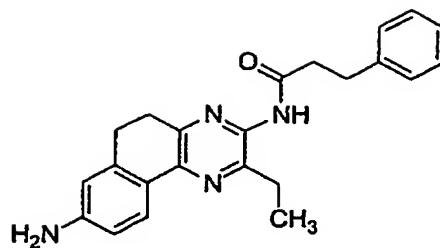
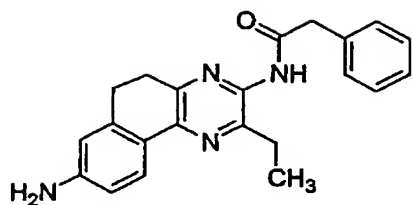
【0 4 4 0】

【化 3 4 1】



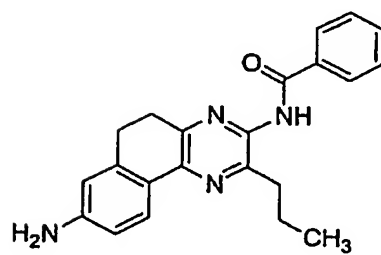
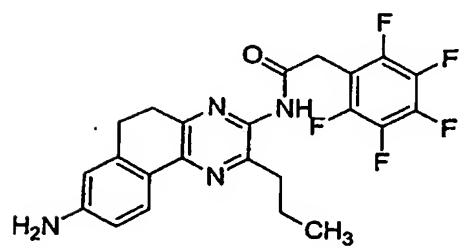
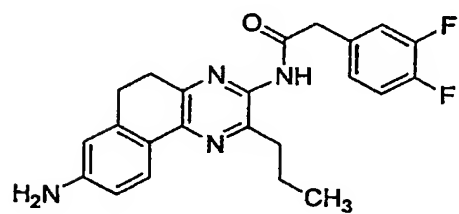
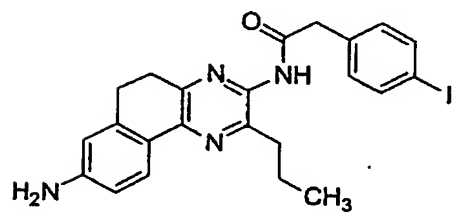
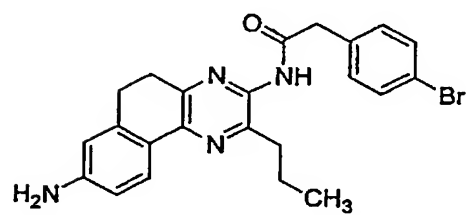
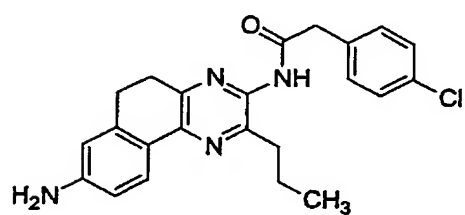
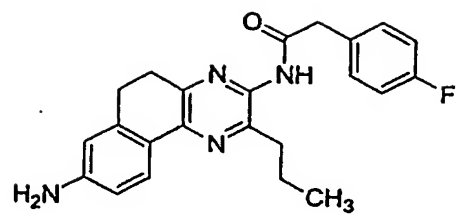
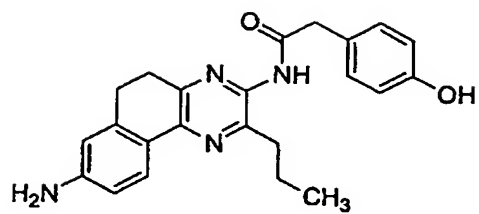
【 0 4 4 1】

【化 3 4 2】



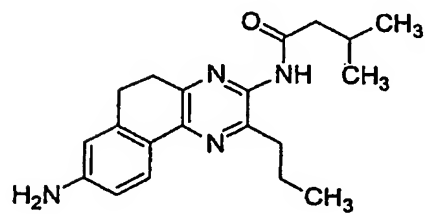
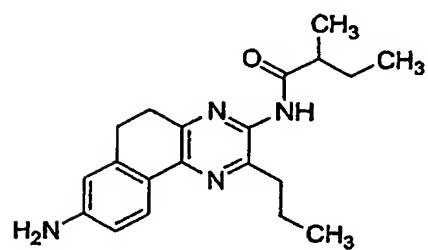
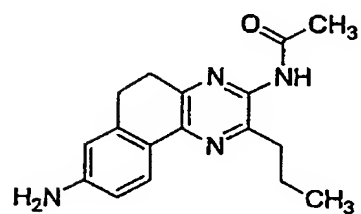
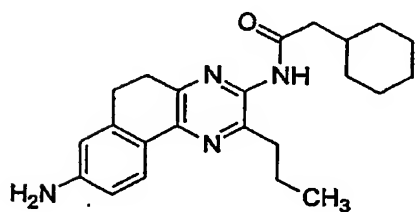
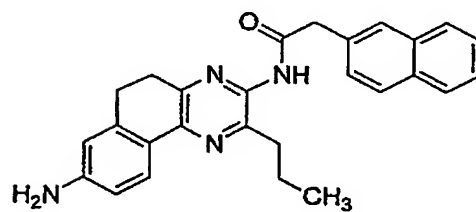
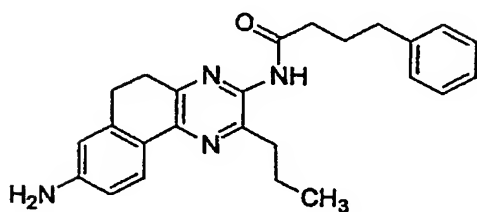
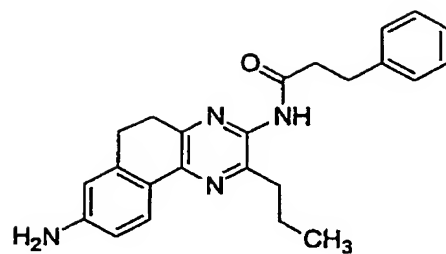
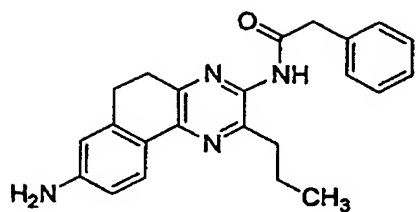
【 0 4 4 2 】

【化 3 4 3】



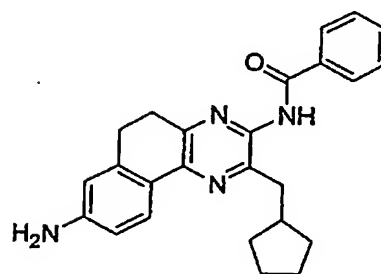
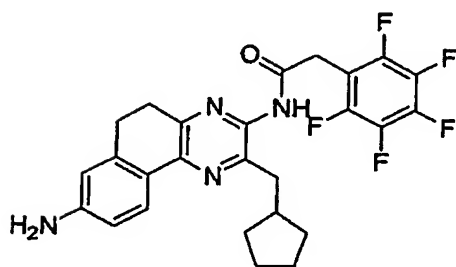
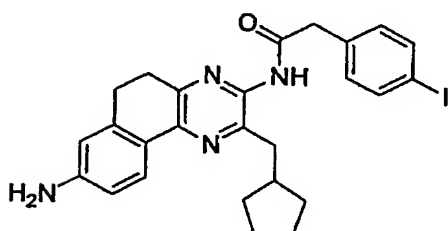
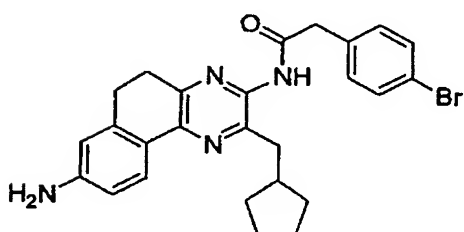
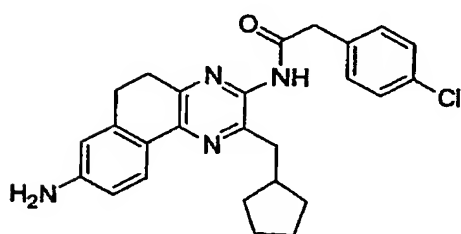
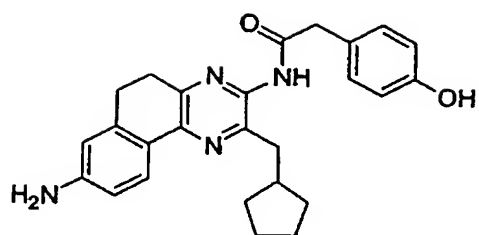
【 0 4 4 3 】

【化 3 4 4】



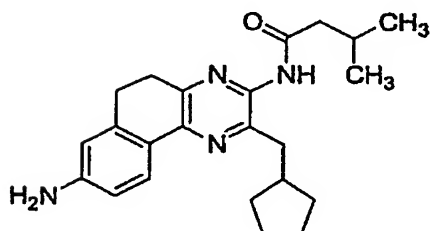
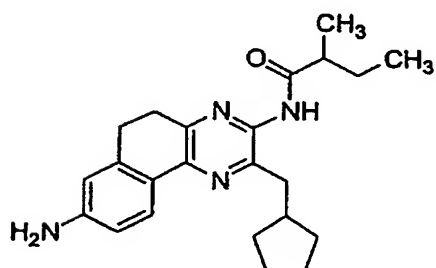
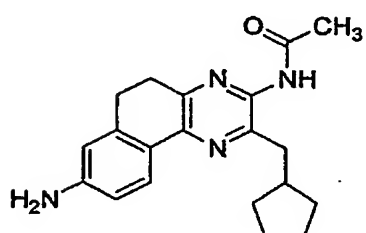
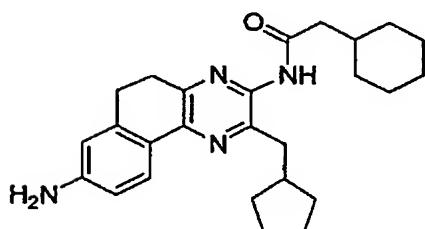
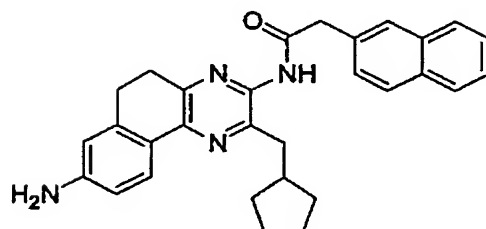
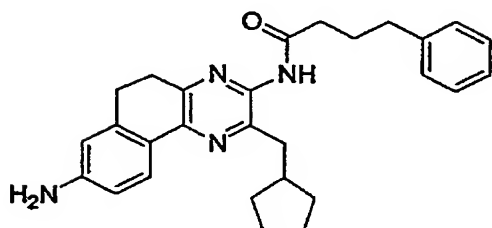
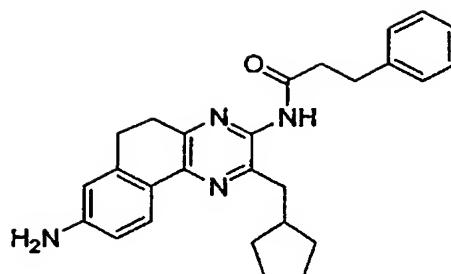
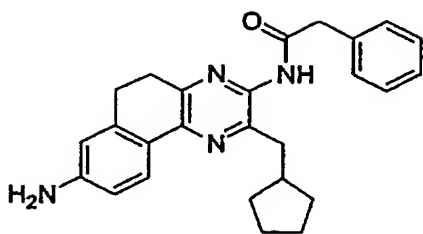
【 0 4 4 4 】

【化 3 4 5】



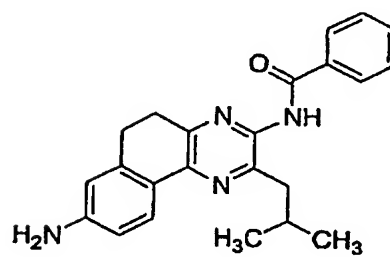
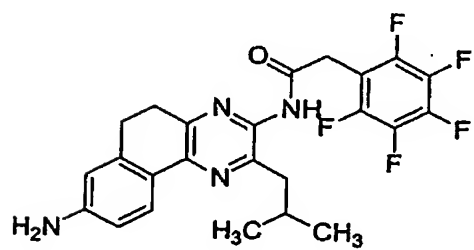
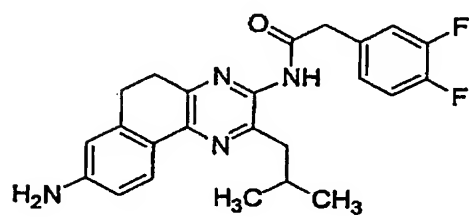
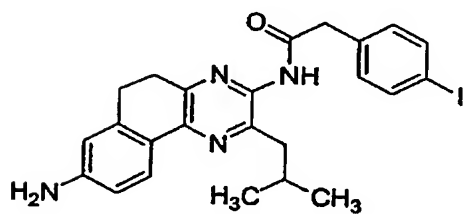
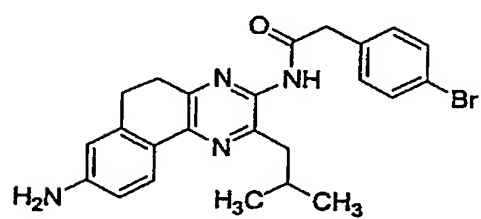
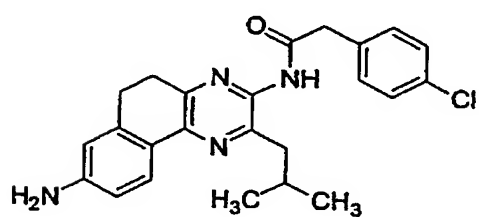
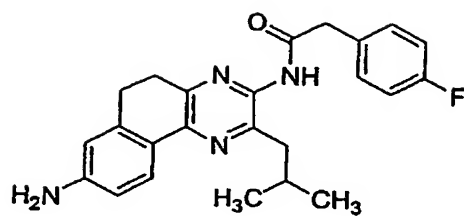
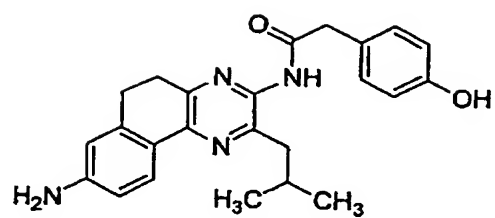
【 0 4 4 5 】

【化 3 4 6】



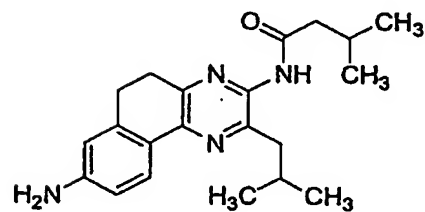
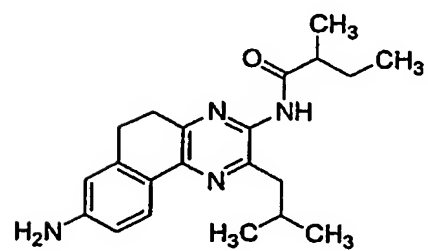
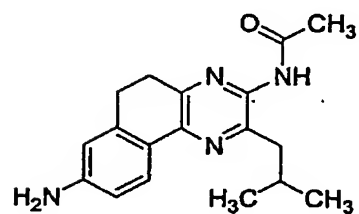
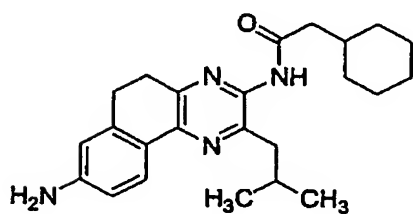
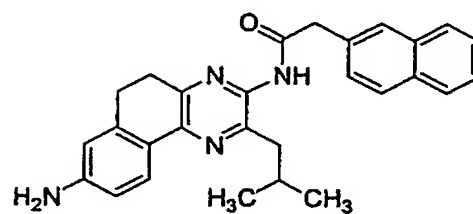
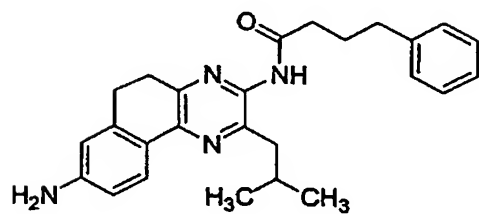
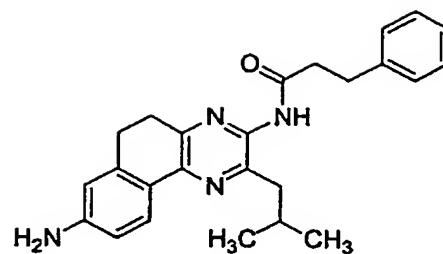
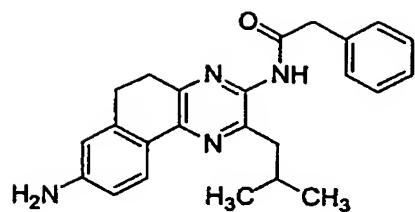
【 0 4 4 6 】

【化 3 4 7】



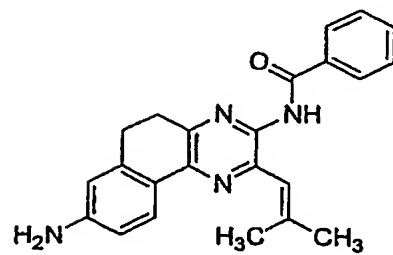
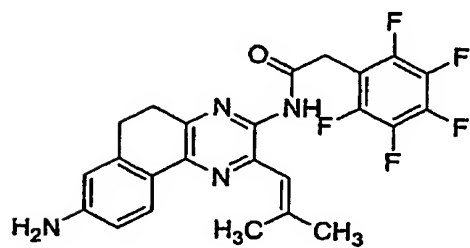
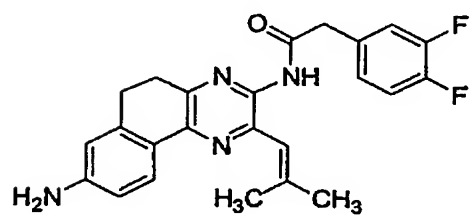
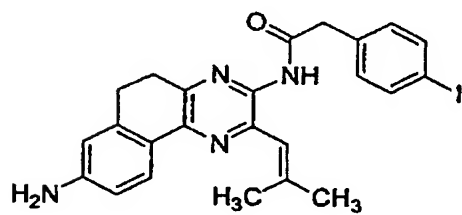
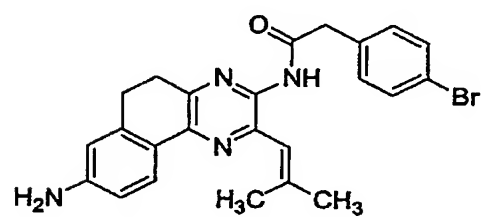
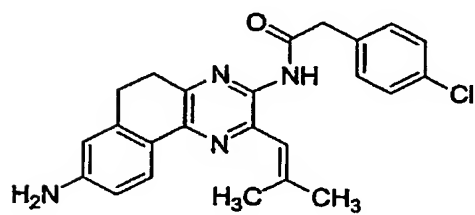
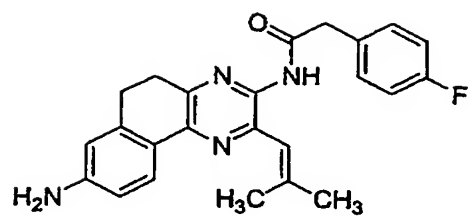
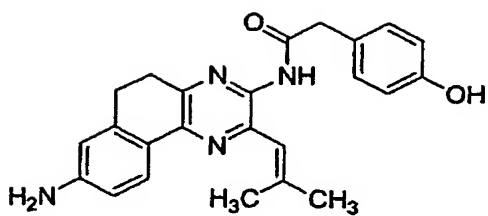
【0 4 4 7】

【化 3 4 8】



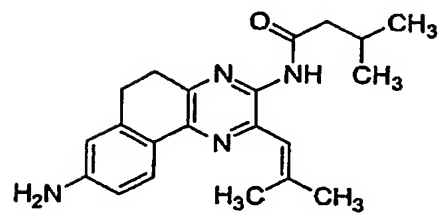
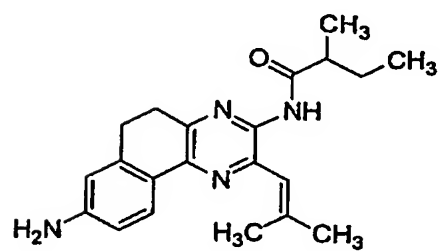
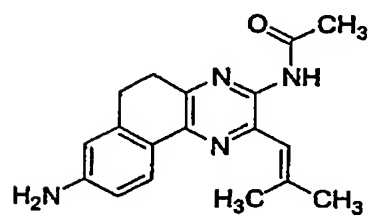
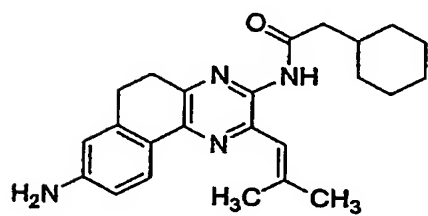
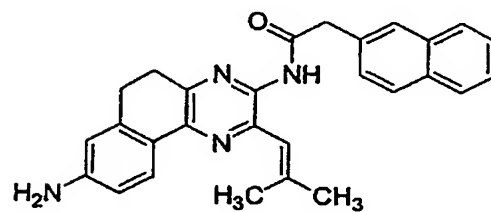
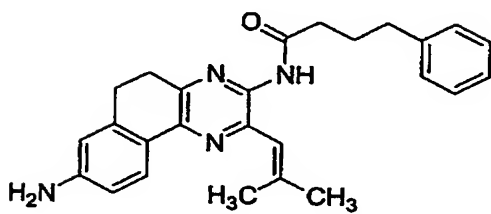
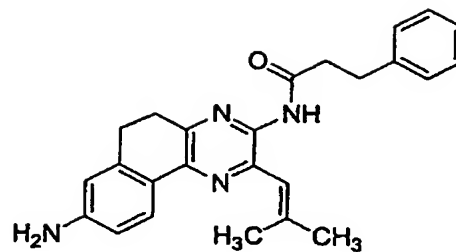
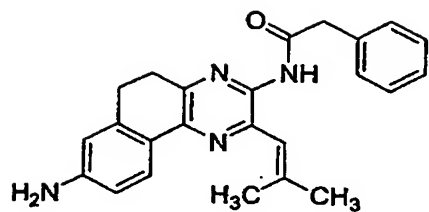
【 0 4 4 8 】

【化 3 4 9】



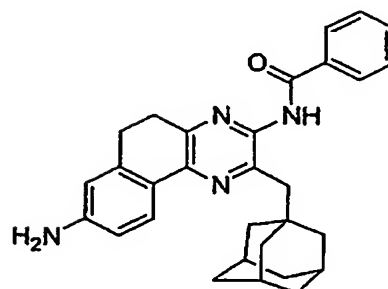
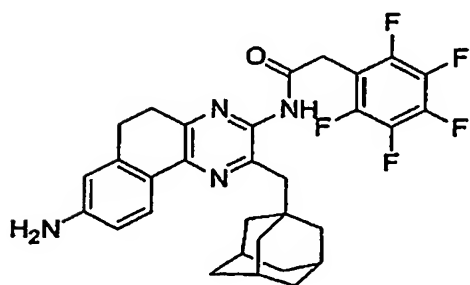
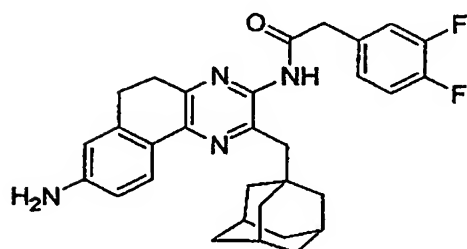
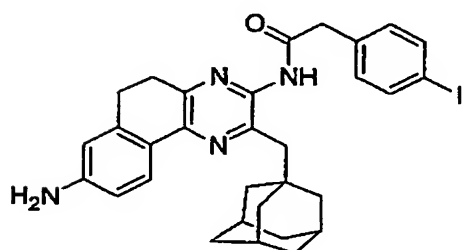
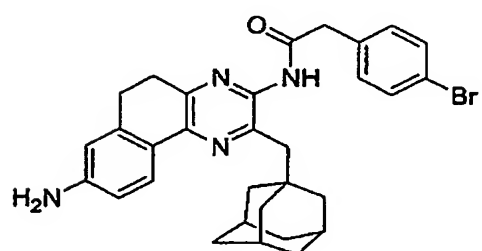
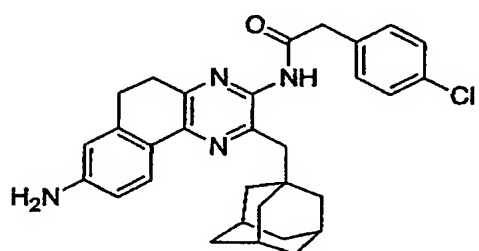
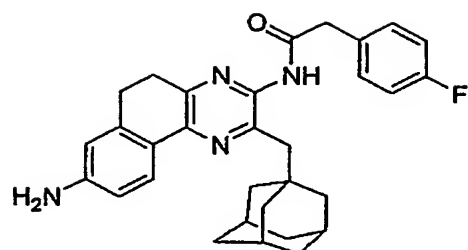
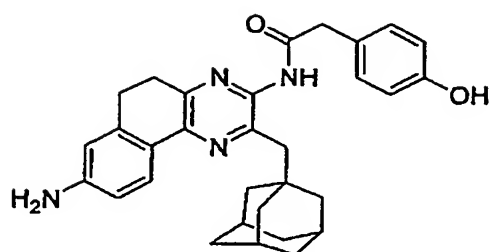
【 0 4 4 9】

【化 350】



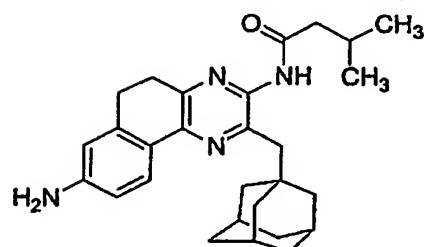
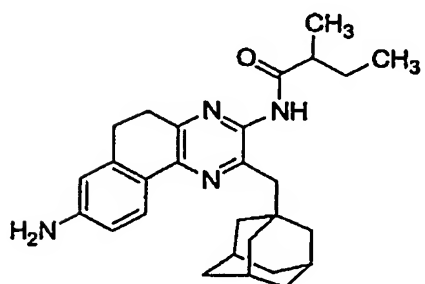
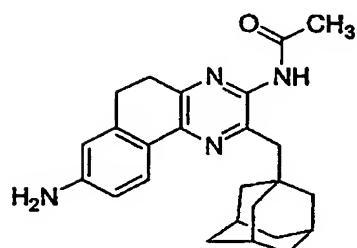
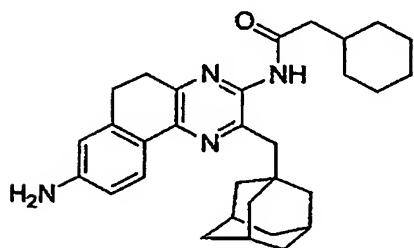
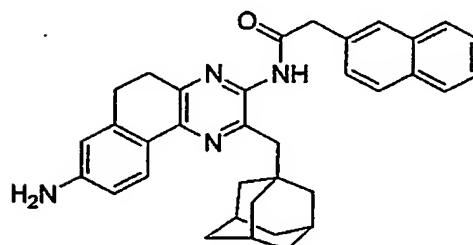
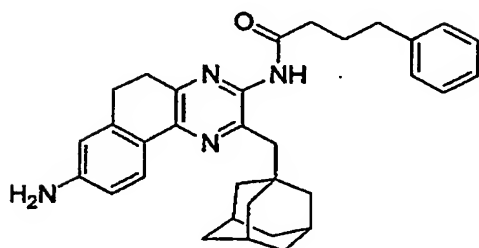
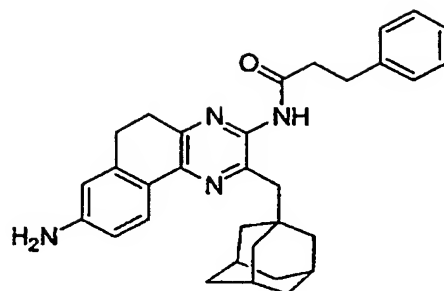
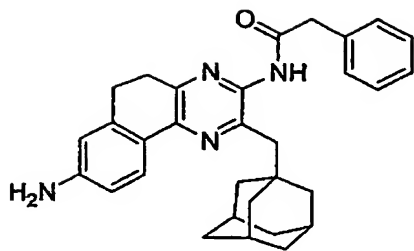
【0450】

【化 351】



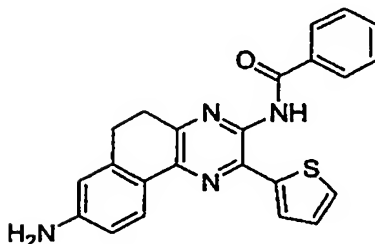
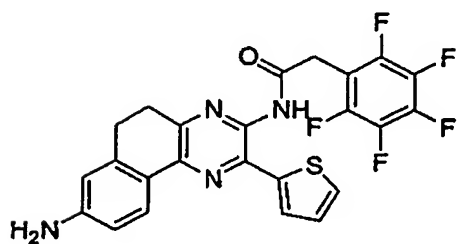
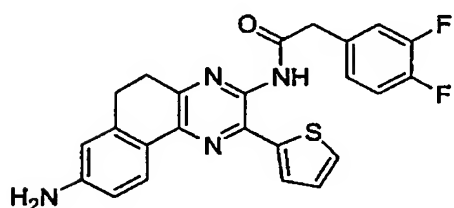
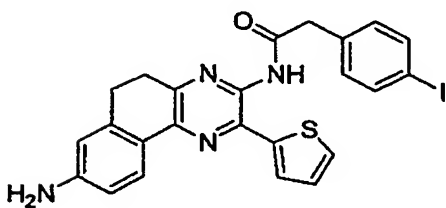
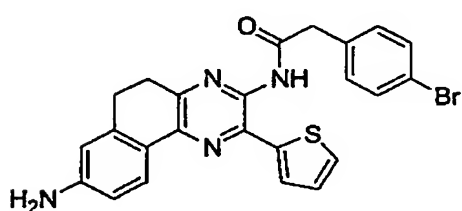
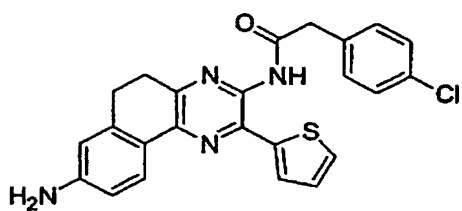
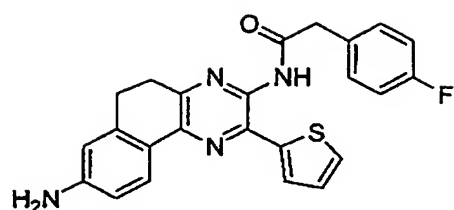
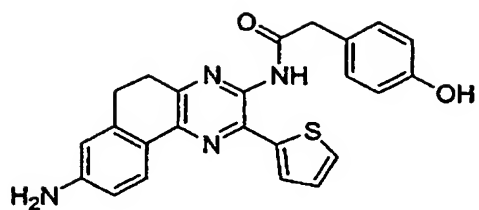
【0451】

【化 3 5 2】



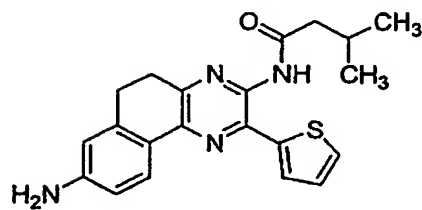
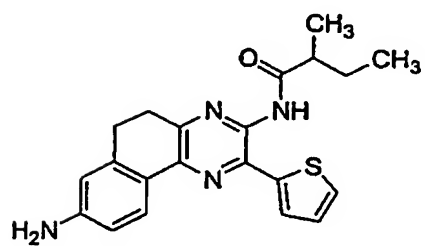
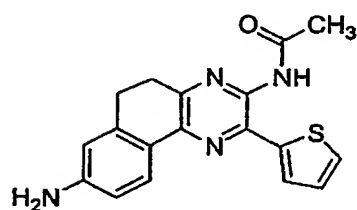
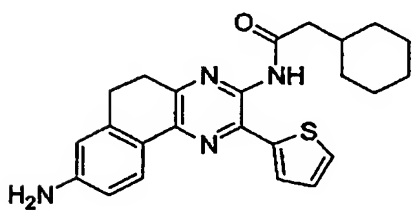
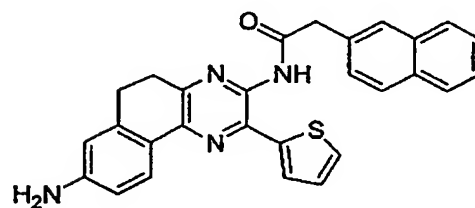
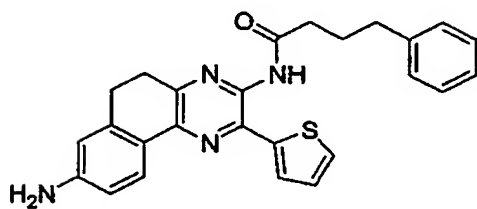
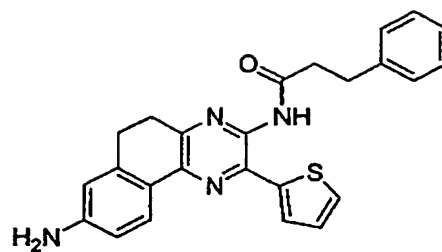
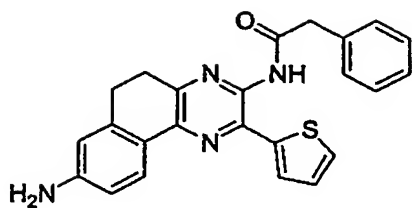
【0 4 5 2】

【化 3 5 3】



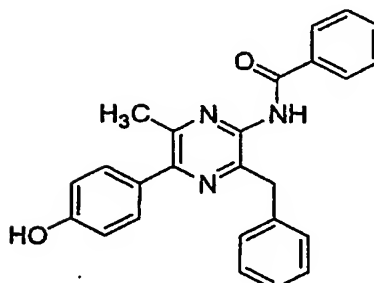
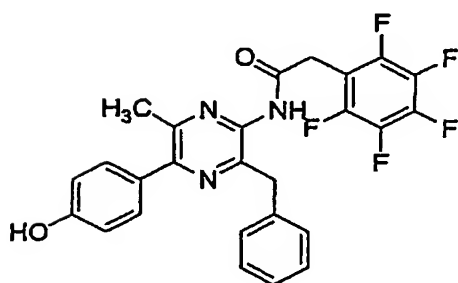
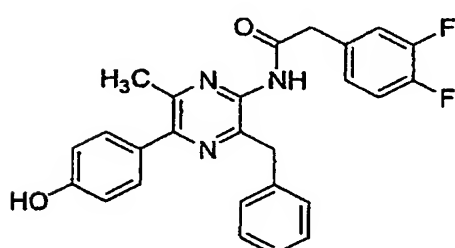
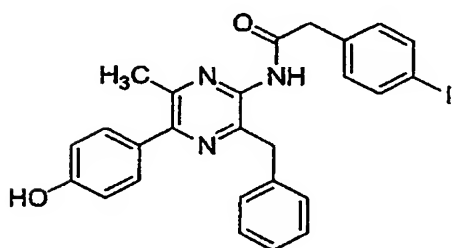
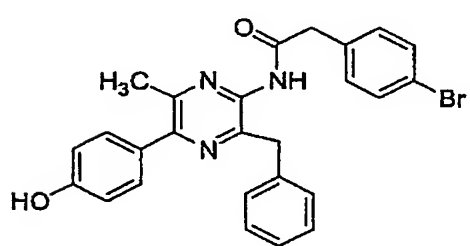
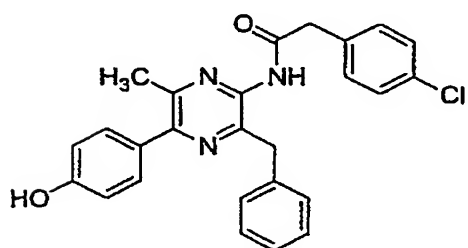
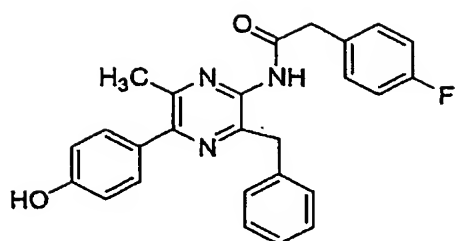
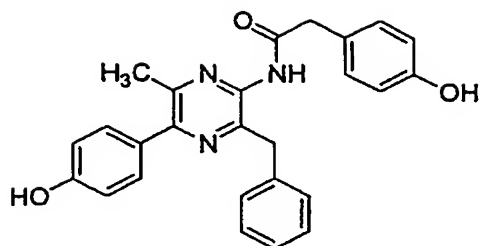
【 0 4 5 3】

【化 3 5 4】



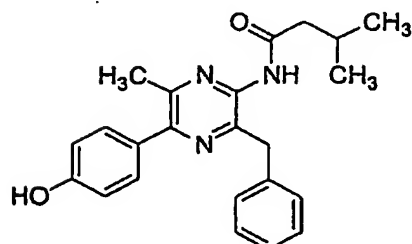
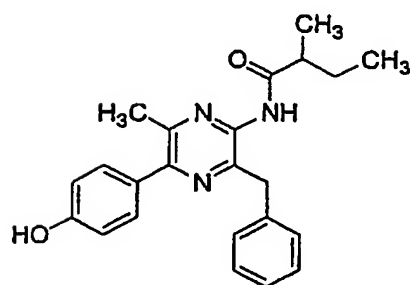
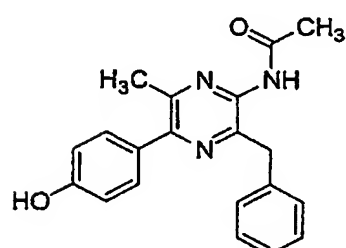
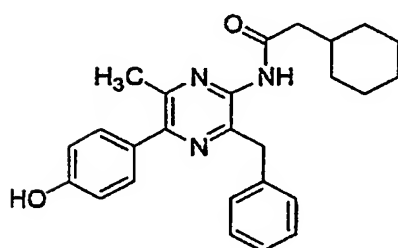
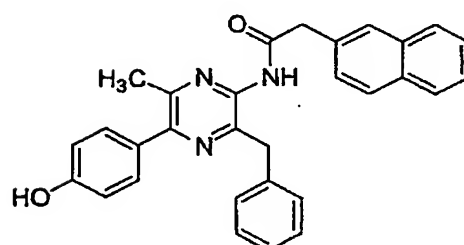
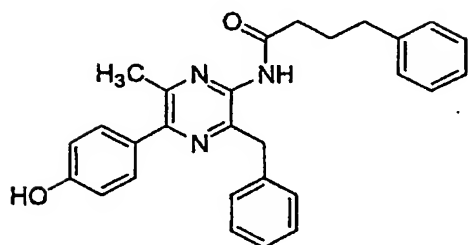
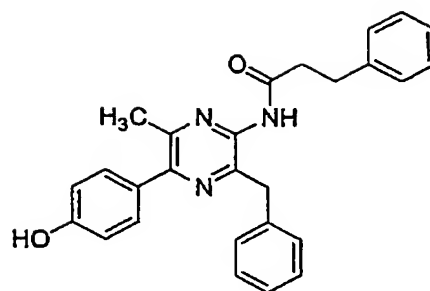
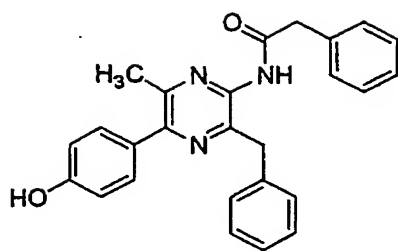
【 0 4 5 4 】

【化 3 5 5】



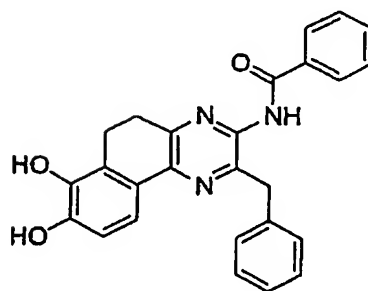
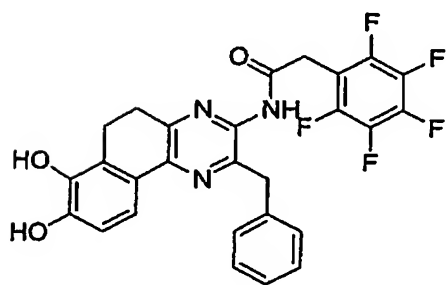
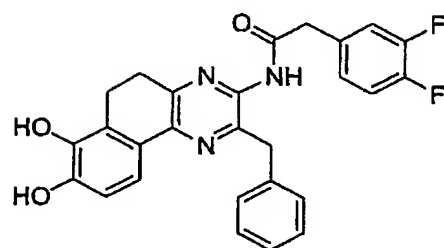
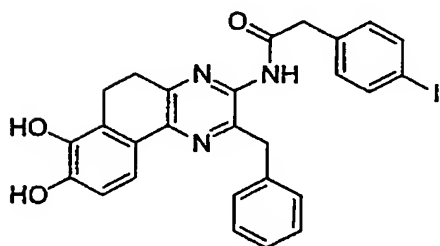
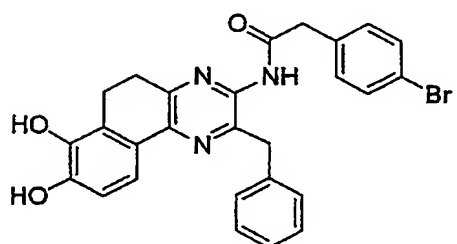
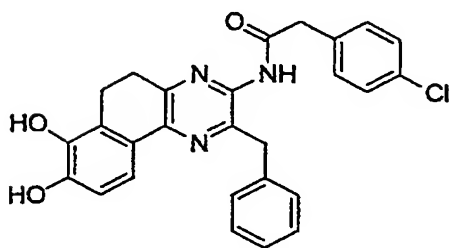
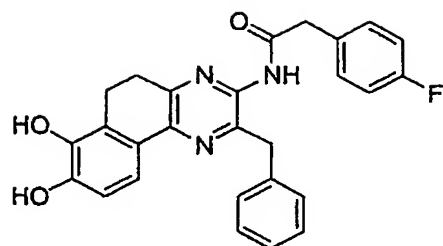
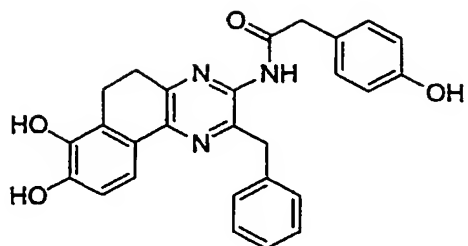
【 0 4 5 5】

【化 3 5 6】



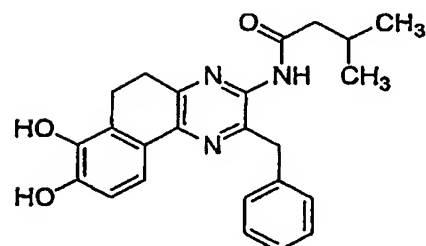
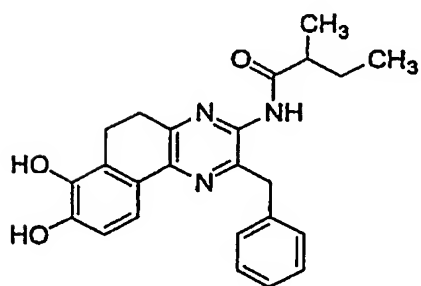
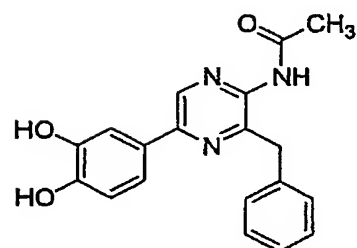
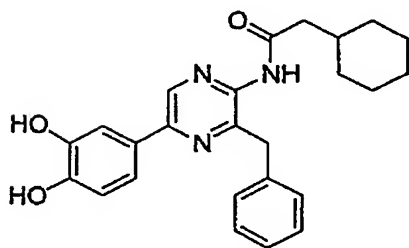
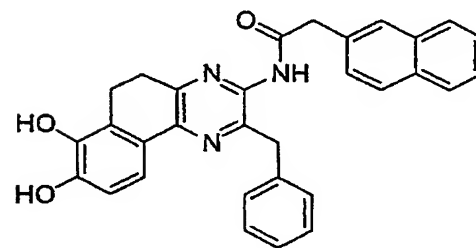
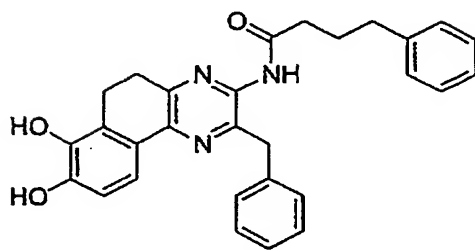
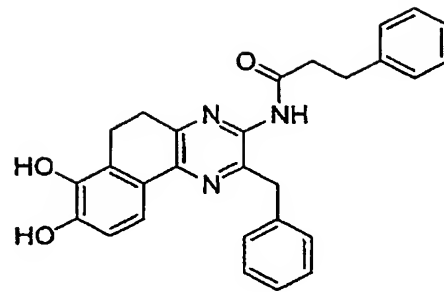
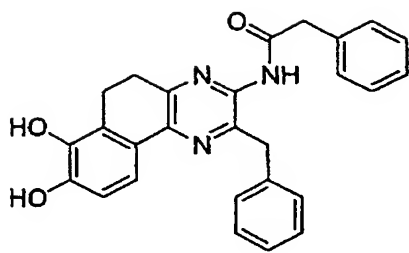
【 0 4 5 6 】

【化 3 5 7】



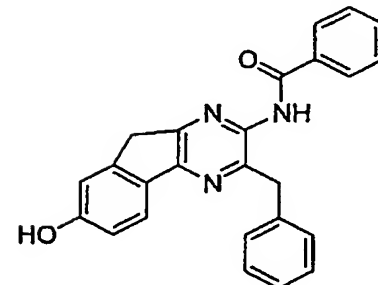
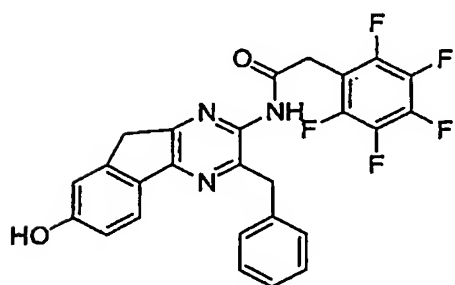
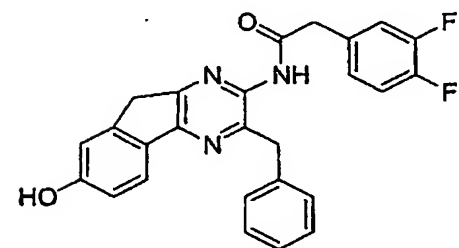
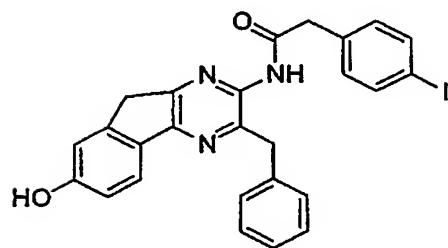
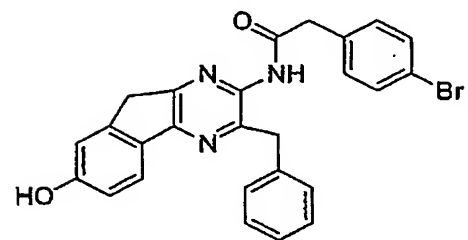
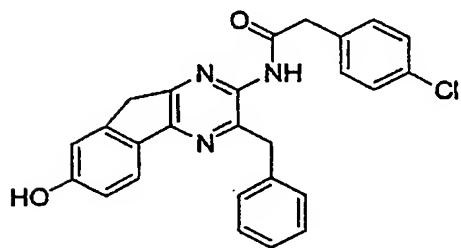
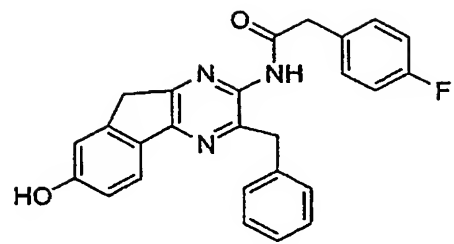
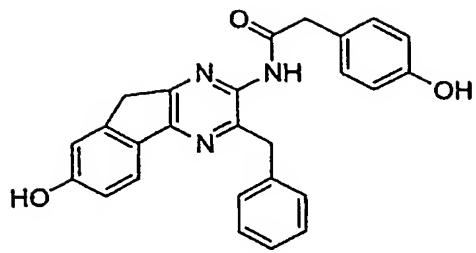
【 0 4 5 7 】

【化 358】



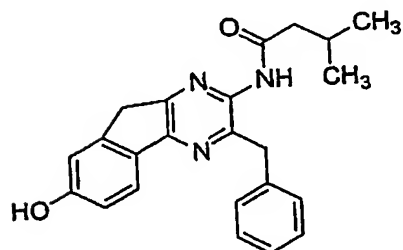
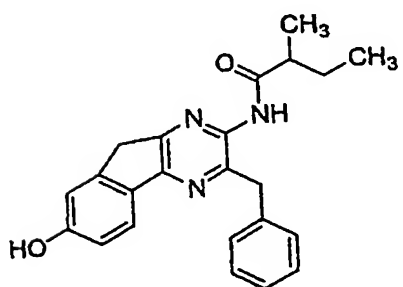
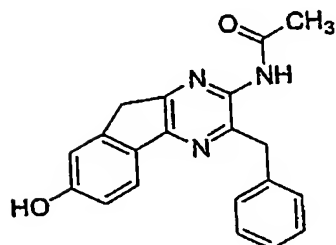
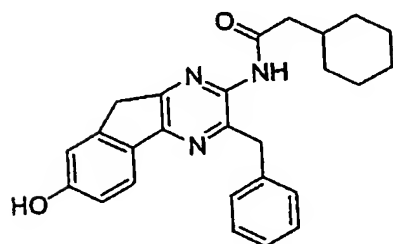
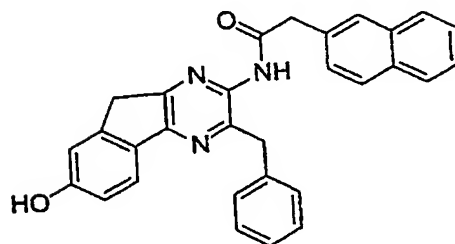
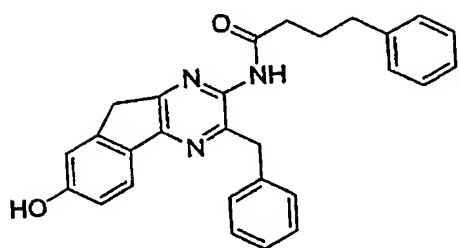
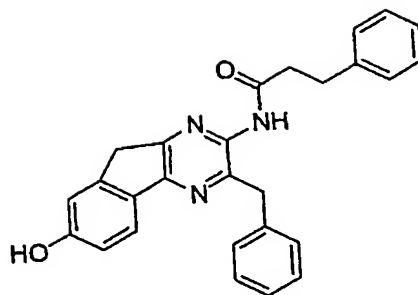
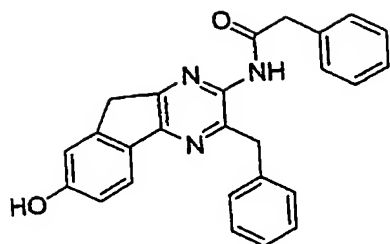
【0458】

【化 3 5 9】



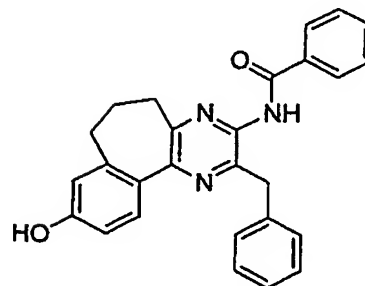
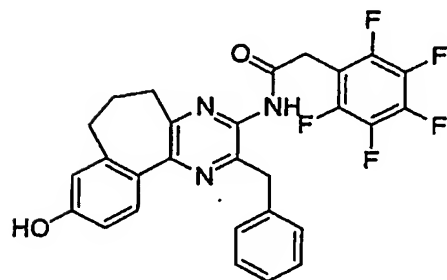
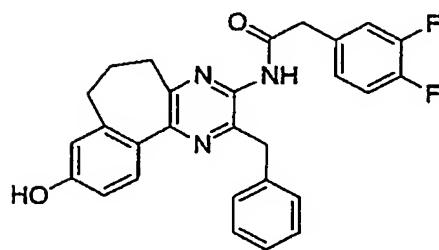
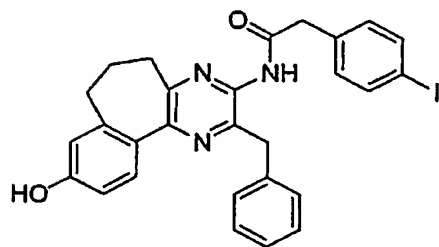
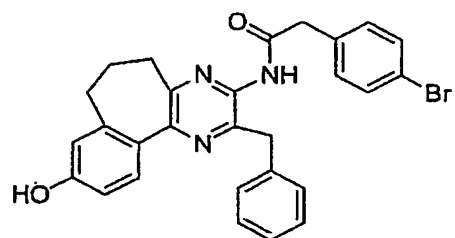
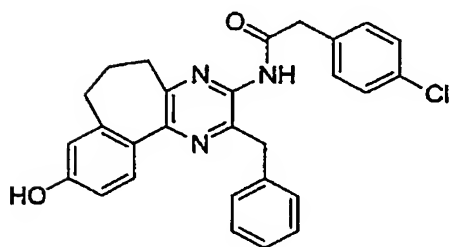
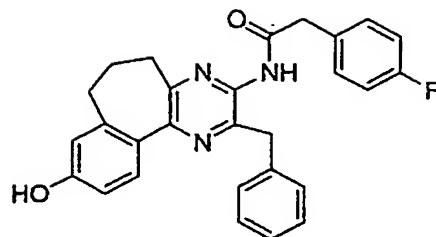
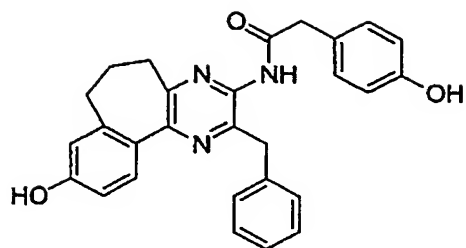
【0 4 5 9】

【化 360】



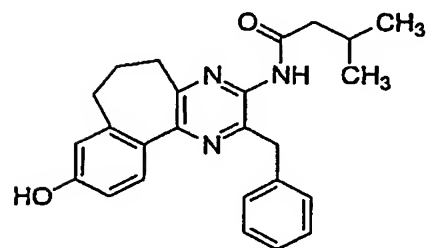
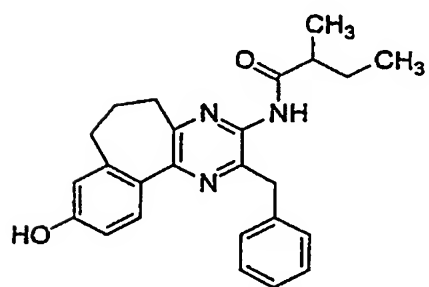
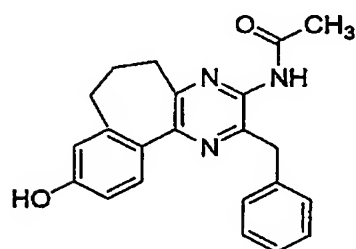
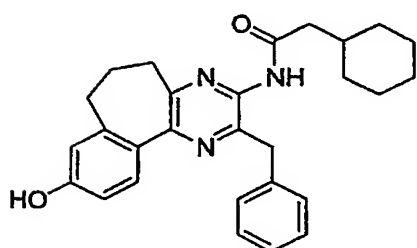
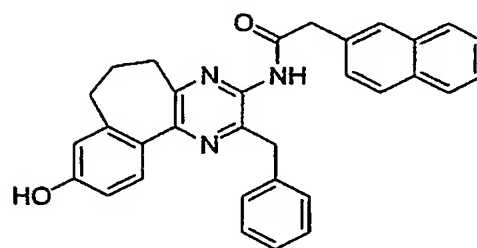
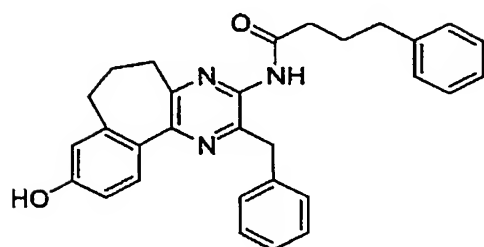
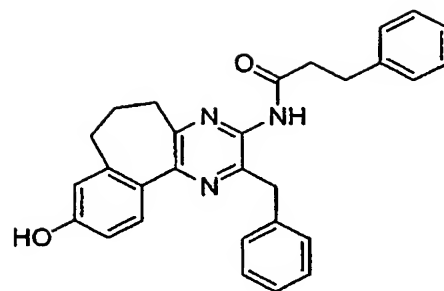
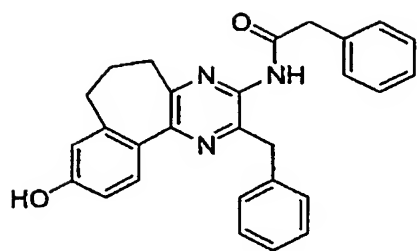
【 0 4 6 0 】

【化 361】



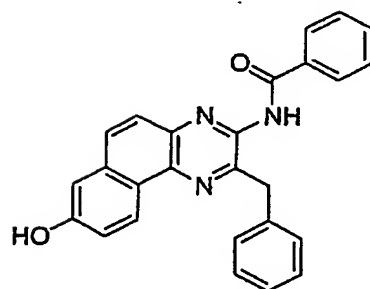
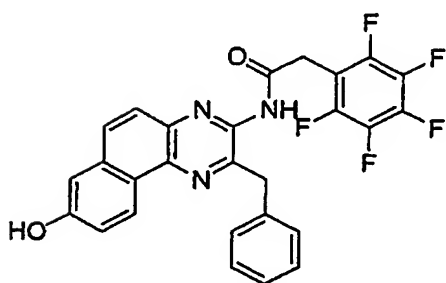
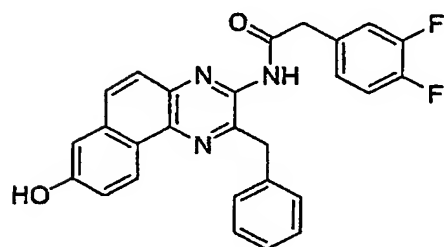
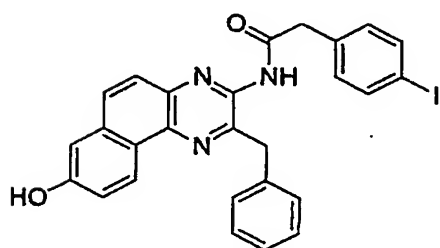
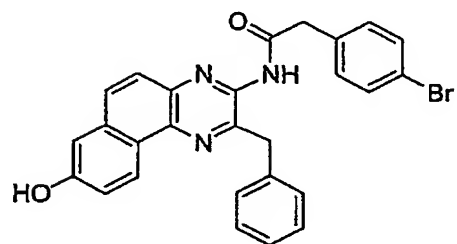
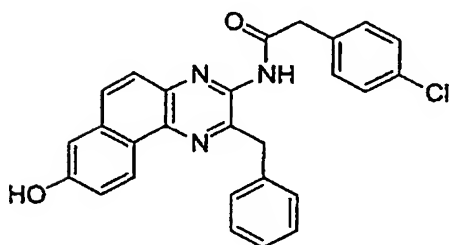
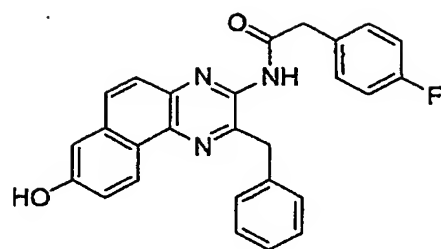
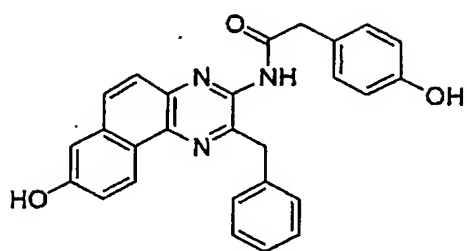
【0461】

【化 3 6 2】



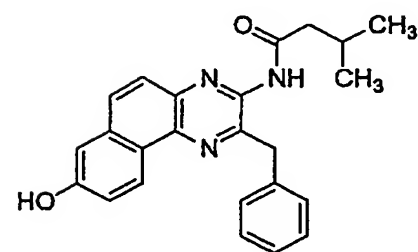
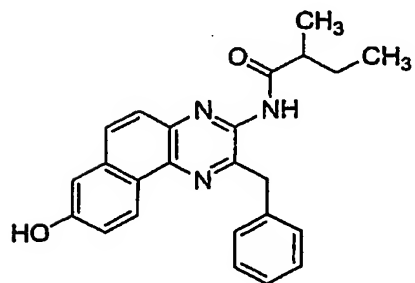
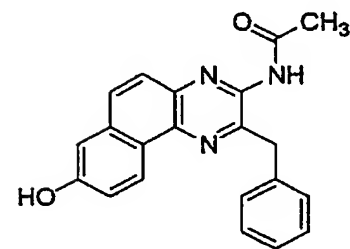
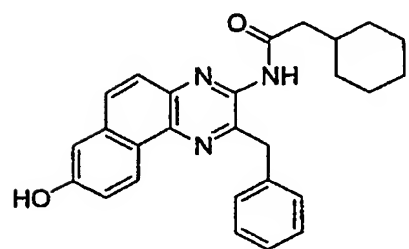
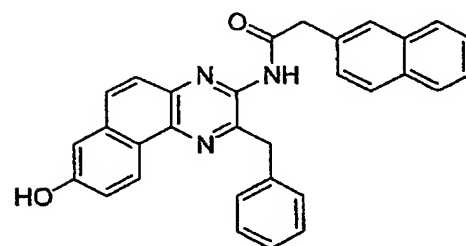
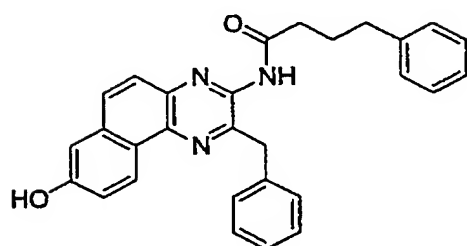
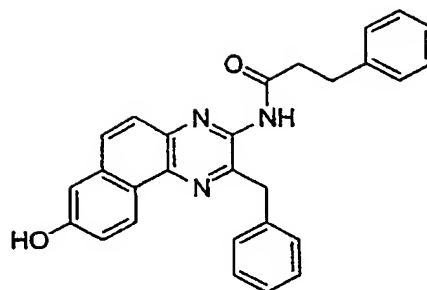
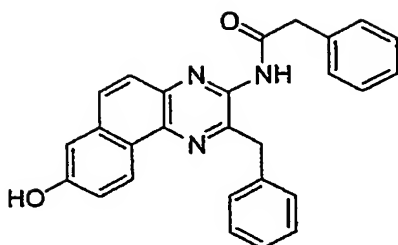
【0462】

【化363】



【0463】

【化364】



【 0 4 6 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHISSO CORPORATION

<120> Fluorescence protein

<130> NP-1388

<160> 4

<210> 1

<211> 189

<212> PRT

<213> Aequorea aequorea

<400> 1

Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
 1 5 10 15

Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser
 20 25 30

Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
 35 40 45

Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
 50 55 60

Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
 65 70 75 80

Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
 85 90 95

Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
 100 105 110

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu

115 120 125
 Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
 130 135 140
 Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
 145 150 155 160
 Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
 165 170 175
 Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 180 185

<210> 2
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Obelia longissima

<400> 2
 Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 1 5 10 15
 Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30
 Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45
 Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80
 Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95
 Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg

100 105 110
 Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140
 Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160
 Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
 165 170 175
 Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190
 Gly Val Pro
 195

<210> 3

<211> 198

<212> PRT

<213> Clytia gregarium

<400> 3

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
 1 5 10 15
 Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
 20 25 30
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45
 Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
 50 55 60
 Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met

65 70 75 80
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95
 Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
 130 135 140
 Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
 145 150 155 160
 Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
 165 170 175
 Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 4

<211> 198

<212> PRT

<213> Mitrocoma cellularia

<400> 4

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15
 Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
 20 25 30
 Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala

35 40 45
 Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
 50 55 60
 Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 65 70 75 80
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95
 Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
 100 105 110
 Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
 115 120 125
 Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
 130 135 140
 Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
 145 150 155 160
 Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
 165 170 175
 His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

【図面の簡単な説明】

【図 1】

発光活性を有する蛍光蛋白質の蛍光スペクトル（実線）および蛍光蛋白質の蛍光スペクトル（点線）を示す図である。

【図 2】

発光活性を有する蛍光蛋白質を 90℃で3分加熱し、24℃に1分、3分、9分、18分放置後測定した蛍光強度を、非加熱（-Heat）の場合との相対強度で

表したものである。

【図 3】

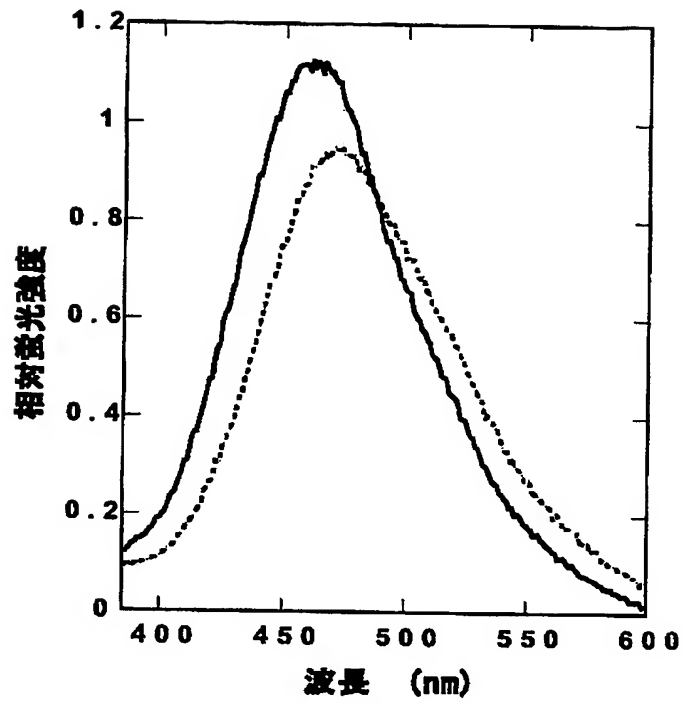
発光活性を有する蛍光蛋白質にセレンテラジンを添加してイクオリンを調製する場合の、生成物量をカルシウムによる発光強度で測定し、インキュベーション時間と相関させたものである。

【図 4】

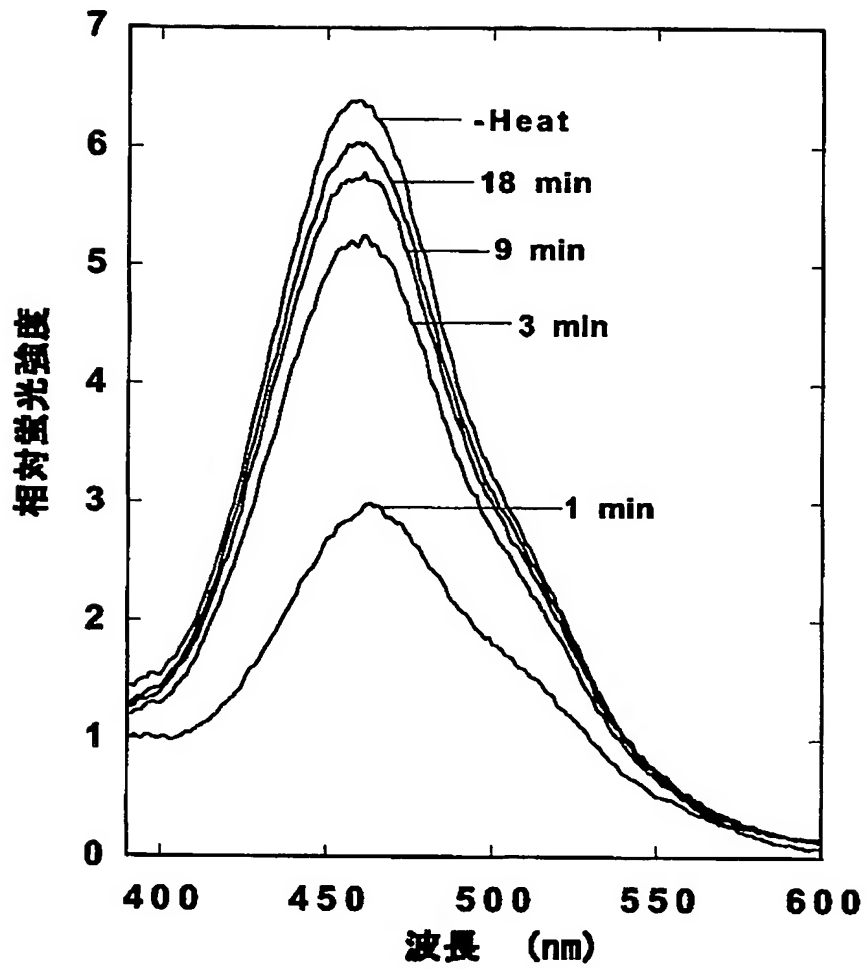
発光活性を有する蛍光蛋白質、蛍光蛋白質およびイクオリンの相互関係を示す図である。

【書類名】 図面

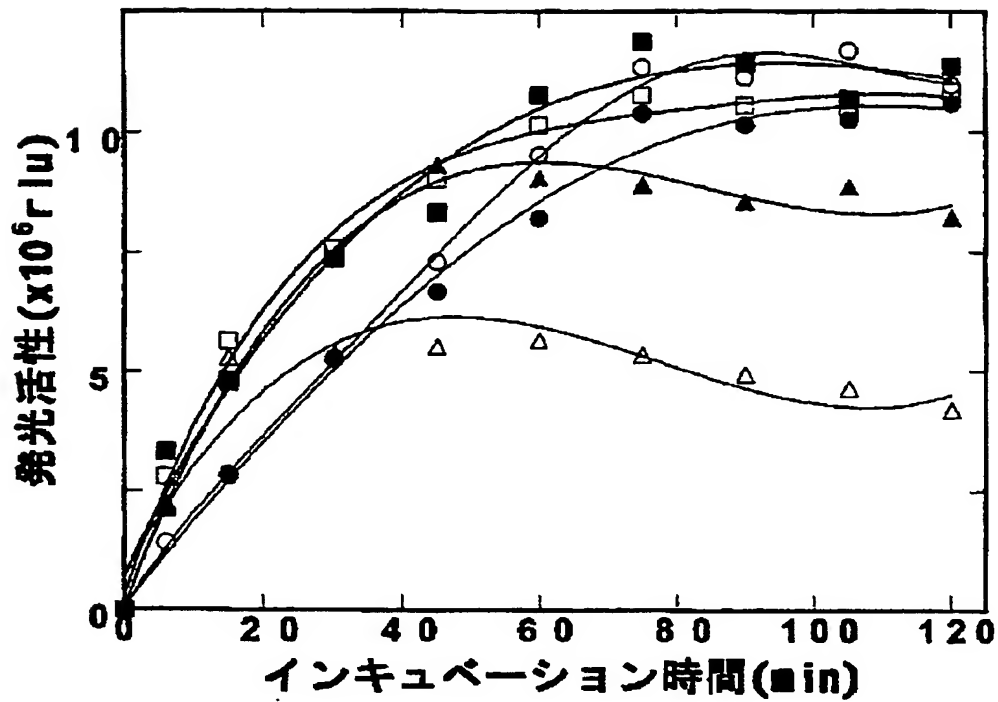
【図 1】



【図 2】

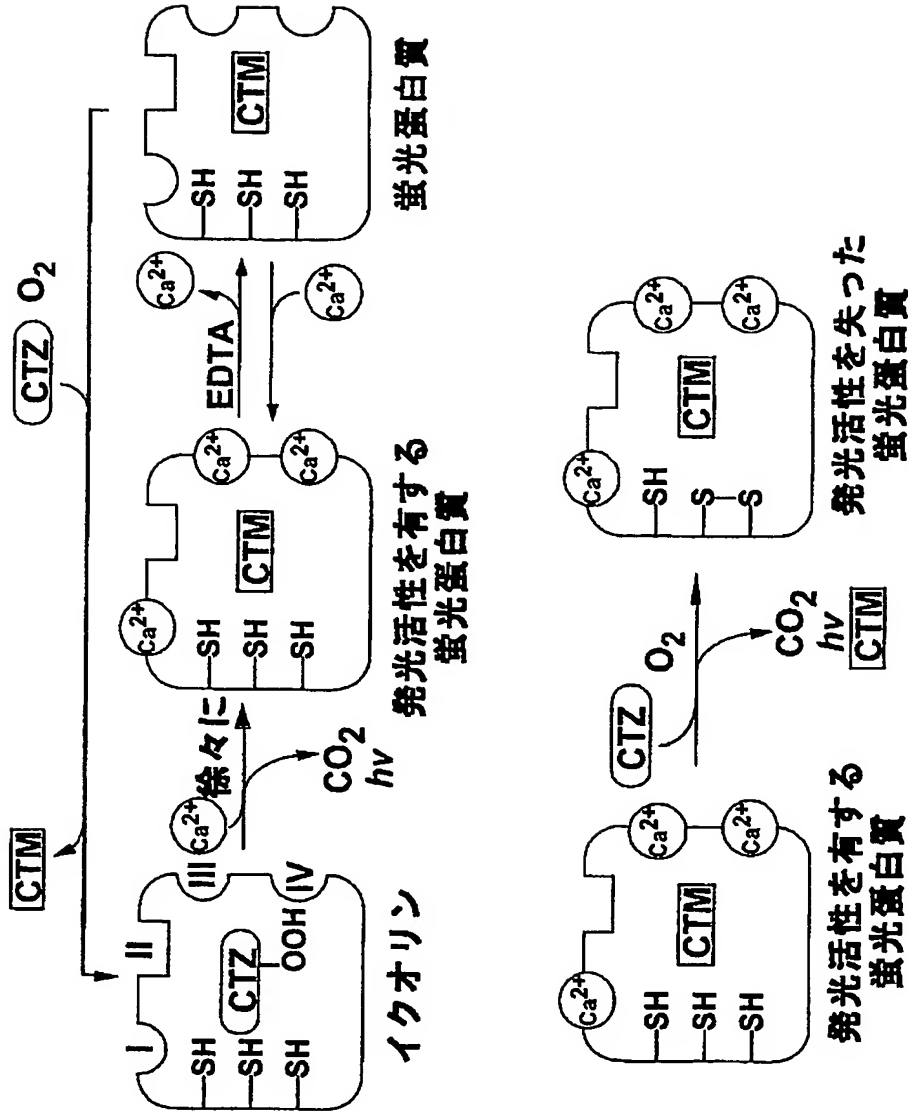


【図3】



- | | | | | | |
|---|---------|----|---|---------|----------|
| ○ | 4°C還元剤 | 無し | ● | 4°C還元剤 | (DTT) 有り |
| □ | 25°C還元剤 | 無し | ■ | 25°C還元剤 | (DTT) 有り |
| △ | 37°C還元剤 | 無し | ▲ | 37°C還元剤 | (DTT) 有り |

【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生物学的な実験におけるマーカーとして有用な新規な発光活性を有する蛍光蛋白質および新規な蛍光蛋白質を提供する。

【解決手段】 発光活性を有する蛍光蛋白質は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とセレンテラミドまたはその類縁化合物およびカルシウムイオンまたはカルシウムイオンと置換可能な2価もしくは3価のイオンより構成され、アポ蛋白質とセレンテラミドのモル比が1:0.95~1.0であり、アポ蛋白質と2価もしくは3価のイオンのモル比が1:1~4である。これは、セレンテラジンの発光を触媒し、かつ蛍光発光能を有するので、マーカーとして利用される。この発光活性を有する蛍光蛋白質から、カルシウムイオン等を除去すると新規の蛍光蛋白質となる。これをセレンテラジンと混合するとカルシウム結合型発光蛋白質となり、カルシウムにより瞬間的に発光するので、マーカーとして利用される。

【選択図】 なし

特願 2003-207397

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002071]

1. 変更年月日

1990年 8月23日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

氏 名

チッソ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.